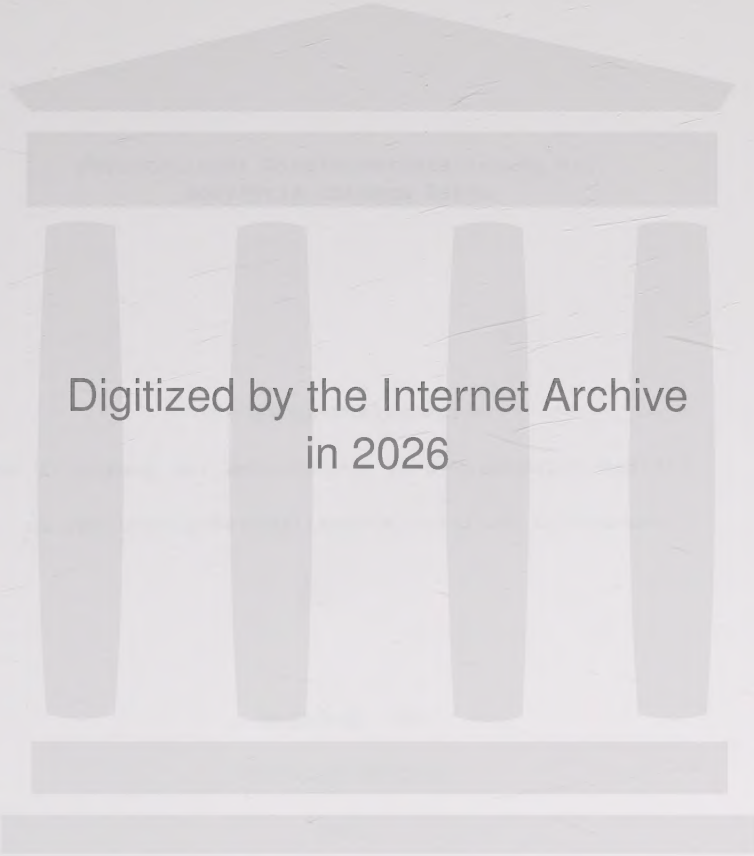


Phototoxische Komplementaktivierung
bei Porphyria cutanea tarda

Christof Schulte

Diss. München
1984





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der

Universität München

Direktor: Prof.Dr.med.Dr.h.c. O. Braun-Falco

Phototoxische Komplementaktivierung bei
Porphyria cutanea tarda

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christof Schulte

aus

Lampertheim

Jahr 1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München.

Berichterstatter: Prof.Dr.Dr.hc. O. Braun-Falco

Dekan: Prof.Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.5.1984

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
 - 1.1. Porphyria cutanea tarda
 - 1.2. Komplementsystem
2. Zielsetzung
3. Material und Methoden
 - 3.1. Phototoxische Komplementaktivierung im Serum von Patienten mit PCT
 - 3.1.1. Patientengut
 - 3.1.2. Bestrahlung der Seren
 - 3.1.3. Komplementbestimmungen
 - 3.2. Phototoxische Komplementaktivierung in Normalserum nach Zusatz von photoaktiven Substanzen
 - 3.2.1. Zusatz von Uroporphyrin
 - 3.2.2. Zusatz von vorbestrahlten Uroporphyrin
 - 3.2.3. Einfluß von Chelatbildnern (EGTA/Mg²⁺ und EDTA) auf die phototoxische Komplementaktivierung
 - 3.3. Effekt therapeutisch wirksamer Substanzen auf die phototoxische Komplementaktivierung
 - 3.3.1. Beta-Carotin
 - 3.3.2. Chloroquin
4. Ergebnisse
 - 4.1. Veränderungen der hämolytischen Komplementaktivität in PCT-Seren nach UVA-Bestrahlung
 - 4.2. Auftreten von C3c-Spaltprodukten in PCT-Seren nach UVA-Bestrahlung
 - 4.3. Vergleich der Methoden zur Bestimmung von Komplementveränderungen
 - 4.4. Veränderungen der Proteinkonzentrationen der Komplementkomponenten C3 und C4 nach phototoxischer Komplementaktivierung
 - 4.5. Phototoxische Komplementaktivierung in Normalserum nach Zusatz von photoaktiven Substanzen
 - 4.5.1. Zusatz von Uroporphyrin
 - 4.5.2. Zusatz von vorbestrahlten Uroporphyrin
 - 4.5.3. Einfluß von Chelatbildnern (EGTA/Mg²⁺ und EDTA) auf die phototoxische Komplementaktivierung



- 4.6. Effekt therapeutisch wirksamer Substanzen auf die
 phototoxische Komplementaktivierung
- 4.6.1. Beta-Carotin
- 4.6.2 Chloroquin
- 5. Diskussion
- 6. Zusammenfassung
- 7. Literatur

1. EINLEITUNG

1.1. Porphyria cutanea tarda

Bei der Porphyria cutanea tarda, im folgenden mit PCT abgekürzt, handelt es sich um eine hepatische Porphyrinstoffwechselstörung, der wahrscheinlich ein vorwiegend in der Leber lokalisierter Enzymdefekt der Uroporphyrinogen-Decarboxylase zugrunde liegt (23, 26, 31, 55) und die mit einer Mehr- bzw. Fehlbildung nicht für die Hämsynthese verwertbarer Porphyrine - vorherrschend dem Uroporphyrin - einhergeht (Siehe Abb. 1). Im Plasma, Urin und Stuhl finden sich meist leicht bis deutlich erhöhte Porphyrinspiegel, während die Werte in den Erythrocyten normal sind. Kennzeichnend ist auch der meist erhöhte Serumeisenspiegel (18).

Für die Manifestation der Erkrankung meist zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr mit deutlicher Bevorzugung des männlichen Geschlechts spielen neben einer genetischen Disposition (24) vor allem ein bestehender Leberschaden und zahlreiche Noxen, wie z.B. Alkohol (2, 16) und Östrogene (6, 8, 19, 42), eine entscheidende Rolle.

Die bei der PCT im Vordergrund stehenden Hautsymptome finden sich hauptsächlich an ständig lichtexponierten Körperteilen wie an den Dorsalflächen der Hände bzw. Unterarme, am Gesicht, Nacken und an den Ohrrändern und treten oft, wenn Verletzungen wie Stoß oder Scheuerung hinzukommen, als reaktionslose, kleinere oder größere Blasen mit derber Decke und serösem oder rötlich-hämorrhagischen Inhalt auf. Die zerstörten Blasen bedecken sich mit Krusten und heilen unter geringer Narbenbildung mit fleckiger Pigmentierung ab (47). Zusätzlich finden sich ausgeprägte Elastose der Haut, Erytheme, Milien, Depigmentierungen, Hypertrichose und sklerodermiforme Veränderungen.

Histologisch findet man in sonnenexponierter Haut von PCT-Patienten eine subepidermale Blasenbildung und im oberen Corium erweiterte Kapillaren, die von einem mäßig entzündlichen Infiltrat umgeben sind. Die Basalmembran ist intakt und weist mehrere Duplikationen auf. Die Zahl der Kollagenfibrillen ist in diesem Bereich vermindert (48, 88). Außerdem wird senile Elastose oder Elasticaschwund beobachtet.

Für die Lichtempfindlichkeit der Patienten werden vornehmlich die photosensibilisierenden Porphyrine verantwortlich gemacht (110), wobei die Photosensibilisierungspotenz in der Reihenfolge vom Uroporphyrin über das Koproporphyrin zum Protoporphyrin abnimmt (17). Bei diesem Vorgang gehen die Porphyrine durch Energieaufnahme in Form von Lichtabsorption bei einem Maximum von 400 nm (siehe Abb. 2) vom Grundzustand, über den Singulett in den aktiven Triplett-Zustand, in dem das Porphyrinmolekül möglicherweise schon Zellmembranen und Zellbestandteile direkt zerstören kann (76). Außerdem kann es in diesem Zustand molekularen Sauerstoff in den hochreaktiven Singulettzustand überführen (9, 109), der ebenfalls zellzerstörende Wirkungen besitzt. Diese Reaktion kann in Anwesenheit von Wasser und Lipiden zur Bildung von Hydrogen- und Lipidperoxyden und freien Radikalen führen, die Zell- und Lysosomenmembranen schädigen (1, 40, 43, 103) (Siehe Abb. 3).

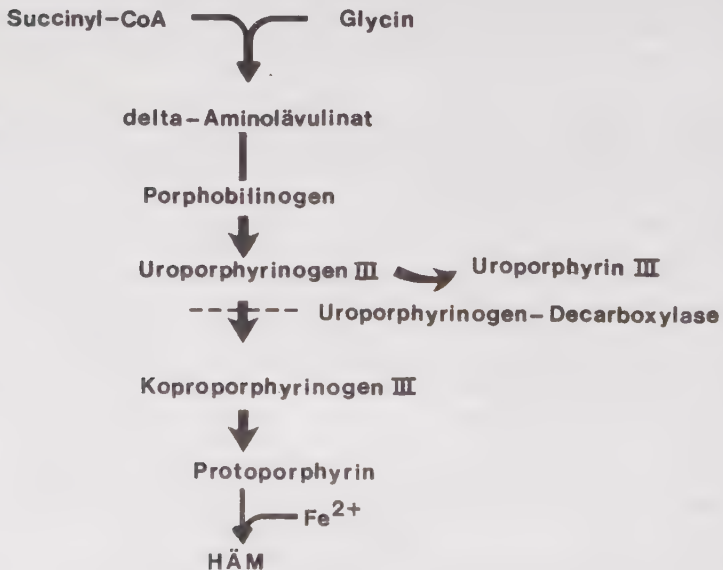


Abb. 1: Enzymdefekt der Uroporphyrinogen-Decarboxylase bei Porphyria cutanea tarda im Rahmen der Hämsynthese

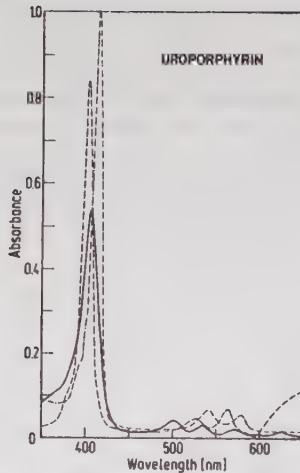


Abb. 2: Absorptionsspektrum von Uroporphyrin III octamethylester (2,5 $\mu\text{mol/l}$) in Chloroform (—) als Kupfer (----) und als Zink-Chelat (-.-.-.-). (nach Doss)

Sekundär entstehen dann Veränderungen am Endothel der Kapillaren und ein intraepitheliales Ödem. Dennoch ist der Pathomechanismus für die Entstehung der Hautläsionen noch weitgehend ungeklärt.

1.2. Komplementsystem

Von Borlande war 1963 erstmals eine Komplementaktivierung im Serum nach Zusatz von Hämatoporphyrin, Eosin und Toluidinblau und nachfolgender Bestrahlung mit fluoreszierendem Licht beschrieben worden (10). In der direkten Immunfluoreszenzuntersuchung finden sich in lichtexponierter Haut von PCT-Patienten Präzipitate und Niederschläge von Komplement

und Immunglobulinen um dermale Gefäße und an dermo-epidermalen Grenzonen (14, 27). Die Beobachtung von Lim und Gigli (64), daß in PCT-Patientenserum nach UVA-Bestrahlung in vitro eine Abnahme der hämolytischen Komplementaktivität auftritt, war ein erster Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des Komplementsystems in der Pathogenese der entzündlichen Veränderungen bei Porphyria cutanea tarda.

Zunächst soll ein kurzer Überblick über das Komplementsystem und seine Aktivierung gegeben werden.

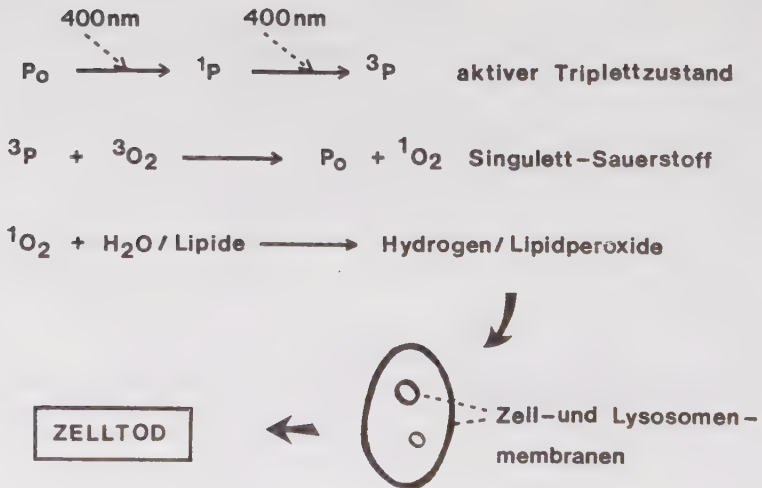


Abb. 3 Mögliche Mechanismen bei der Photosensibilisierung durch Porphyrine in der Haut von PCT-Patienten.
 P_0 = Porphyrin im Grundzustand
 1p = Porphyrin im Singulettzustand

Das Komplementsystem besteht aus annähernd 20 Proteinen, die etwa 10 % der Serumglobulinfraktion ausmachen und u.a. wichtige Reaktionspartner bei verschiedenen Antigen-Antikörperreaktionen darstellen.

Die Aktivierung dieses Systems kann durch eine Vielzahl von natürlich vorkommenden oder synthetischen Substanzen ausgelöst werden. Sie erfolgt abhängig von der Natur des aktivierenden Prinzips auf zwei unterschiedliche Wegen, dem klassischen und alternativen Aktivierungsweg (Siehe Abb. 4).

Der klassische Aktivierungsweg umfaßt die Komponenten C1q,r,s, C4, C2, C3 und C5 und wird durch die Bindung von C1q an Antigen-Antikörperkomplexe ausgelöst (3). Die Komponenten C1r, C1s und C2 sind Proenzyme, die durch limitierte Proteolyse in aktive Enzyme gespalten werden. Die Komponenten C4 und C3 stellen die natürlichen Substrate dieser Enzyme dar (37). Durch die limitierte Proteolyse von C4 und C2 entsteht ein bimolekularer Komplex C4b2a (C3-Konvertase) (11, 91) mit enzymatischer Aktivität für C3, der magnesiumabhängig ist (82). Nach der proteolytischen Spaltung von C3 kann ein neuer Enzymkomplex C4b2a3b (C5-Konvertase) gebildet werden (111), der auf C5 einwirkt.

Der alternative Aktivierungsweg umfaßt eine Gruppe von Proteinen (C3, C3b, Faktor B, Faktor D und Properdin), die in Abwesenheit von Antigen-Antikörperkomplexen und der klassischen Komponenten C1, C4 und C2 ebenfalls die limitierte Proteolyse von C3 und C5 bewirken können (81). Die alternative Komplementaktivierung kann u.a. durch Endotoxine von gramnegativen Bakterien (30), durch Bestandteile von Hefezellen (Zymosan) (29, 60, 90) und durch aggregiertes IgA (89) ausgelöst werden.

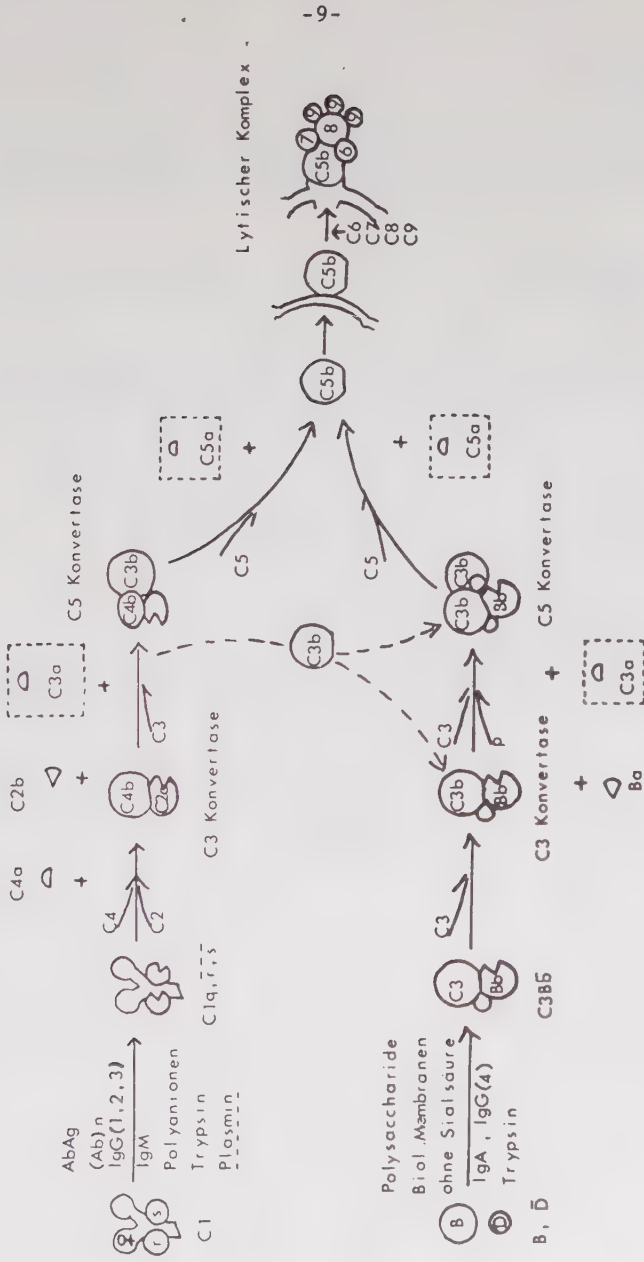
Die Endphase der Komplementaktivierung von C5 bis C9 verläuft in beiden Aktivierungswegen identisch: durch das Fragment C5b wird die nicht-enzymatische Bildung eines zytolytischen makromolekularen Komplexes C5b, 6, 7, 8, 9 ermöglicht, der mit Zellmembranbestandteilen reagiert und dadurch zur Zytolyse führt (49). Die biologische Aktivität des Komplementsystems ist jedoch nicht auf die Bildung dieses zytolytischen Endprodukts beschränkt. Von wesentlicher pathophysiologischer Bedeutung ist die Freisetzung von biologisch

aktiven Spaltprodukten (C3a, C3b, C5a) während der Komplementaktivierung durch die limitierte Proteolyse der Komponenten C3 und C5 (13, 61, 80, 115).

Da das Komplementsystem eine Tendenz zur positiven Rückkopplung bzw. Selbsterhaltung der einmal in Gang gesetzten Aktivierung zeigt, sind spezifische Inhibitoren und Kontrollproteine (C3b-Inaktivator, C4-bindendes Protein, Beta-1-H und Carboxypeptidase N) auf den Stufen C3 und C5 der Komplementaktivierung wirksam (56, 100, 113). Das C3b-Fragment kann sich über sogenannte Immunrezeptoren an Zellmembranen binden und dadurch eine Vielzahl zellulärer Funktionen steuern, z.B. stimuliert C3b die Phagozytose von Fremdpartikeln und die Freisetzung von lysosomalen Enzymen aus Makrophagen und aus neutrophilen Granulozyten (38).

C3b wird anschließend von dem Enzym C3b-Inaktivator und dem Kofaktor Beta-1-H in die Fragmente C3c und C3d gespalten (95). Die Anaphylatoxine C3a und C5a sind hochaktive Peptide, die permeabilitätssteigernd wirken, glatte Muskulatur kontrahieren und Histamin aus Mastzellen und Basophilen freisetzen können. Das C5a-Fragment wirkt zusätzlich chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, auf Makrophagen und Monozyten (13, 61, 80, 115). Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß eine Freisetzung von C3a und C5a auch über eine nicht-immunologische Aktivierung des Komplementsystems erfolgen kann (12, 15, 107), zu der auch möglicherweise die phototoxische Komplementaktivierung durch Porphyrine gehört.

KLASSISCHE KOMPLEMENTAKTIVIERUNG



-9-

Lytischer Komplex

ALTERNATIVE KOMPLEMENTAKTIVIERUNG

Abb.4: Schema der Komplementaktivierung über den klassischen und alternativen Weg

2. ZIELSETZUNG

In dieser Arbeit sollte der Mechanismus der UVA-induzierten, phototoxischen Komplementaktivierung bei Porphyria cutanea tarda an Hand eines eigenen Patientenguts untersucht werden.

Weiterhin sollte überprüft werden ob die phototoxische Komplementaktivierung von Substanzen, die bei der Therapie der PCT eingesetzt werden, beeinflußt wird.

An Hand der Untersuchungsergebnisse wird diskutiert, inwieweit eine licht-induzierte Komplementaktivierung auch in vivo an der Pathogenese der Hauterscheinungen beteiligt sein kann.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Phototoxische Komplementaktivierung im Serum von Patienten mit PCT

3.1.1. Patientengut

Das Patientengut (siehe Tab. 1) umfaßte 14 Personen mit Porphyria cutanea tarda, von denen 8 männlichen und 6 weiblichen Geschlechts waren. Die Diagnose war in allen Fällen durch die typischen klinischen und labor-chemischen Befunde gesichert. Der Krankheitsbeginn schwankte je nach Patient zwischen 1968 und 1981. Das Alter der Patienten betrug bei Krankheitsbeginn durchschnittlich 53,9 Jahre; der jüngste Patient war bei Manifestation der Krankheit 40, der älteste Patient 72 Jahre alt. Das Alter der Patienten zur Zeit der Blutentnahme betrug im Durchschnitt 59,8 Jahre.

Das klinische Bild entsprach der typischen Symptomatik mit Blasenbildung an lichtexponierter Haut und vermehrter Verletzbarkeit. Bei einigen Patienten traten auch Hypertrichose, Pigmentstörungen und Elastose auf (vgl. Tab. 1).

4 Patienten waren zu Zeit der Blutentnahme mit 2 x 125 mg Resochin pro Woche behandelt, aber wiesen klinisch noch Krankheitsaktivität auf. Die übrigen 10 Patienten waren unbehandelt. 5 dieser 10 unbehandelten Patienten hatten zu einem früheren Zeitpunkt Resochin erhalten und befanden sich zur Zeit der Blutentnahme in Remission. Die Plasmaporphyrinwerte wurden in den Seren 1-5 durch das Institut für Klinische Biochemie von Prof. Doss an der Universität Marburg und in den Seren 6-14 von der Dermatologischen Hautklinik in Düsseldorf mit Hilfe eines dünnschichtchromatographischen Verfahrens (22) gemessen. Die Bestimmung der Porphyrinwerte im Urin erfolgte durch Auftrennung mit Ionenaustauschersäulen und anschließender spektrophotometrischer Messung nach Doss et al (21). Der durchschnittliche Plasmaporphyrinspiegel aller Patienten betrug 3,6 µg/dl. Unter Hinzunahme eines Normalwertes von 1,1 µg/dl Gesamtporphyrine im Plasma (20) lag der Porphyrinspiegel bei 8 Patienten deutlich im pathologischen Bereich, bei den übrigen 6 Patienten dagegen noch im Normbereich. Neben dem klinischen Erscheinungsbild konnte

die Diagnose bei diesen 6 Patienten durch die erhöhten Werte an Gesamtporphyrinen im Urin gestellt werden. Das Ausmaß der Porphyrinausscheidung im Urin war bei den Patienten sehr unterschiedlich ausgeprägt. Der niedrigste Wert wurde mit 35 ug Gesamtporphyrinen/l, der höchste Wert mit 11490 ug/l ermittelt (Mittelwert: 2624 ug/l).

Für die Untersuchungen wurden die Patienten in drei Gruppen unterteilt:

1. unbehandelte Patienten, aktives Krankheitsstadium (n=5)
2. unbehandelte Patienten in klinischer Remission (n=5)
3. behandelte Patienten (n=4)

Eine Kontrollgruppe wurde aus 6 Normalpersonen gebildet.

Tab.1: Patientengut:

Nr.	Name	Geschlecht	Krankheitsbeginn	Alter bei Krankheitsbeginn	Alter z.Zt. der Blutentnahme	klinische Symptomatik	Therapie z.Zt. der Blutentnahme	Plasma-porphyrinkonzentration (ug/dl)	Uroporphyrinkonzentration (ug/l)
1	J.K.	♀	1975	58	65	Blasen, leichte Verletzbarkeit	keine	5,4	5227
2	S.K.	♀	1981	46	47	Blasen, leichte Verletzbarkeit	keine	1,0	1921
3	M.G.	♀	1981	63	64	Blasen, leichte Verletzbarkeit	keine	12,5	5350
4	A.W.	♂	1980	57	59	Blasen	keine	4,0	11490
5	R.H.	♂	1979	69	72	Blasen, Hyperpigment. z.Zt. keine	keine	9,0	-
6	H.B.	♂	1978	72	76		2x125mg/W. Resochin	2,9	4335
7	W.H.	♂	1971	46	57	Blasen, Elastose, Verletzbarkeit, Hyperpig.	2x125mg/W. Resochin	0,6	530
8	R.E.	♂	1968	52	66	Blasen, leichte Verletzbarkeit	2x125mg/W. Resochin	7,0	4275
9	H.H.	♂	1978	43	47	Blasen, leichte Verletzbarkeit, Hypertrichose, Hyperpig.	2x125mg/W. Resochin	0,5	425
10	A.K.	♂	1970	58	70	Blasen, Elastose, Verletzbarkeit, Pigment.	keine	1,3	115
11	H.K.	♂	1978	46	50	Blasen, Elastose, Verletzbarkeit, Pigment.	keine	0,5	95
12	B.D.	♀	1978	40	44	Blasen, Hypertrichose, Hyperpigmentierung	keine	0,5	50
13	J.D.	♀	1978	54	58	Blasen, Pigmentstör.	keine	0,5	35
14	L.H.	♀	1970	51	63	Blasen, leichte Verletzbarkeit	keine	5,0	510

3.1.2. Bestrahlung der Seren

Material:

UVA SUN 5000 der Firma Mutzhas München (83),

- Bestrahlungsspektrum: 320-460 nm (84 % der Gesamtenergie der Bestrahlungsquelle liegt zwischen 320-400 nm; 16 % der Gesamtenergie liegt zwischen 400-460 nm);
- Energiemaximum: 360-390 nm (siehe Abb. 5);
- Abgegebene Leistung in 40 cm Abstand von der Lichtquelle: 1 J/cm² pro 25-35 sec. (Schwankungsbreite) gemessen mit Centra UV Meßgerät Nr. 1071.

Vom Plexiglas der Petrischalen wurde ca. 8,5 % der UVA-Strahlung absorbiert.

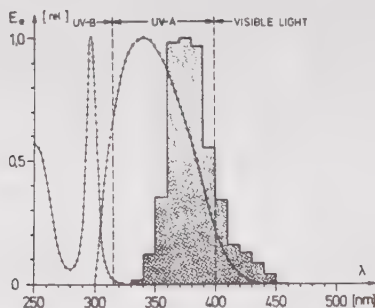


Abb. 5: Relativer Energieausstoß von UVA SUN 5000 in Abhängigkeit von der Wellenlänge (320-460 nm). Wirkungsspektrum für UVB-induzierte Erytheme (●-●-●) und UVA-induzierte Sofortpigmentierung (o-o-o). (nach 83)

Durchführung (vgl. Abb. 6):

Alle vorbereitenden Arbeiten wurden in einem abgedunkelten Laborraum unter Rotlichtbeleuchtung ausgeführt. Jeweils 1 ml eines Patientenserums wurde in 5 silikonisierte Petrischalen mit 5,5 cm Durchmesser und 1,5 cm Höhe aus Plexiglas ge-

ben, sodaß der Boden von einer dünnen Serumschicht bedeckt war. Die Petrischalen wurden während der Bestrahlung zur Kühlung auf Eis gelagert.

Der Abstand zwischen Bestrahlungsquelle und Serum betrug 40 cm. Die Bestrahlungszeiten wurden so fraktioniert, daß Probe 1 mit 1 J/cm^2 , Probe 2 mit 5 J/cm^2 , Probe 3 mit 10 J/cm^2 und Probe 4 mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt wurden. Probe 5 wurde während der Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA mit einem lichtundurchlässigen Tuch abgedeckt und diente als lichtgeschützte Kontrolle. Probe 6 wurde nicht in den Bestrahlungsvorgang einbezogen und diente als unbestrahlte Kontrolle. Nach der Bestrahlung wurden die Serumproben fraktioniert und bei -70°C aufbewahrt.

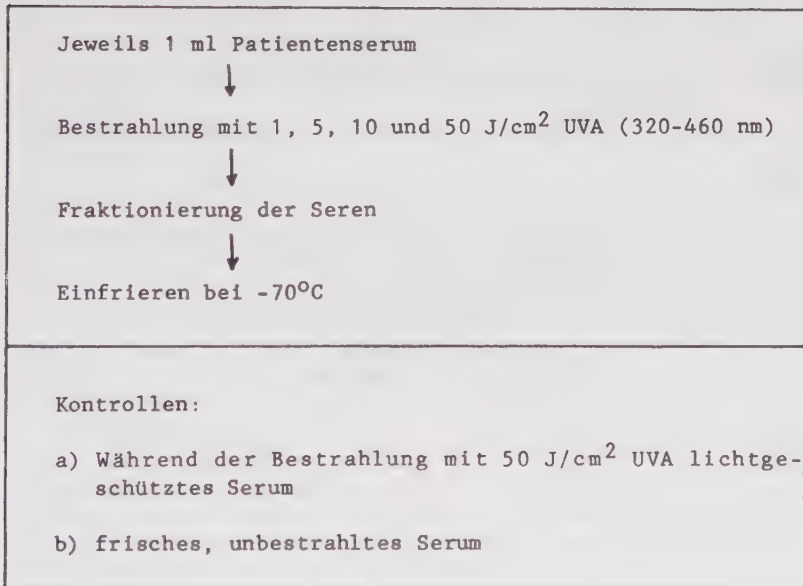


Abb. 6: Bestrahlung der Serumproben

3.1.3. Komplementbestimmungen

In allen bestrahlten Serumproben (Probe 1-4) sowie in den lichtgeschützten bzw. unbestrahlten Kontrollen (Probe 5 und 6) wurde

- a) die hämolytische Aktivität des Serumkomplements funktionell nach der Methode von Rapp und Borsos (93) und
- b) das Ausmaß der proteolytischen Spaltung der Komplementkomponente C3 immunchemisch durch zweidimensionale Immunelektrophorese (CIEP) nach Laurell bestimmt (58).
- c) In einigen ausgewählten Seren wurden außerdem die Proteinkonzentrationen der Komplementkomponenten C3 und C4 immunchemisch durch radiale Immundiffusion nach der Methode von Mancini gemessen (70).

METHODE 1: Bestimmung der Gesamtkomplementaktivität im Serum (CH50)

Prinzip:

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß man eine standardisierte Menge von Schaferythrocyten herstellt und mit Anti-Schaf-Hämolsin sensibilisiert. Die standardisierte Menge der sensibilisierten Erythrocyten wird mit verschiedenen Verdünnungen des zu messenden Serums inkubiert. Die Bindung der ersten Komplementkomponente C1q an den zellständigen Immunkomplex führt zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Lyse der Zelle. Das Ausmaß der eingetretenen Hämolyse wird durch die spektrophotometrische Messung des freigesetzten Hämoglobins verfolgt. Die hämolytische Gesamtkomplementaktivität des Serums (CH50) wird als diejenige Menge von Komplement definiert, die in der Lage ist 50% der eingesetzten Zellen zu lysieren und wird in CH50-Einheiten pro ml Serum angegeben.

Material:

- 5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz, Merck, Art.Nr. 6318
- 5,5 Diäthylbarbitursäure, Merck, Art.Nr. 276
- 0,03 M CaCl₂-Lösung

- 0,1 M MgCl_2 -Lösung
- Gelatine für die Mikrobiologie, Merck
- 0,1 M EDTA-Lösung (hergestellt aus Titriplex III, Merck, Art.Nr. 8418)
- Hammelblut konserviert, Behring Institut, K.Nr. 303053
- Ambozeptor 6000, Anti-Sheep Hemolysin (polyvalente Antikörper) Behringwerke K.Nr. 302126 C
- Meerschweinchen Komplement konserviert, Behringwerke, K.Nr. 303157

Verwendete Puffer:

Die Komplementpuffer wurden nach Nelson et al (85) hergestellt.

- Veronalpuffer (5x conc.)

83 g NaCl
10,19 g 5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz
34,58 ml 1 N HCl

Zus. ad 2000 ml aqua bidest. und den pH-Wert auf 7,5 einstellen.

- Gelatinehaltiger Veronalpuffer (GVB⁻)

200 ml Veronal 5x conc.
10 ml Gelatine (10%ig)

Zus. ad 1000 ml aqua bidest.

- Gelatinehaltiger Veronalpuffer mit Mg^{2+} und Ca^{2+} (GVB⁺⁺)

200 ml Veronal 5x conc.
10 ml Gelatine (10%ig)
5 ml 0,03 M CaCl_2 -Lösung
5 ml 0,1 M MgCl_2 -Lösung

Zus. ad 1000 ml aqua bidest.

- Gelatinehaltiger Veronalpuffer mit EDTA-Zusatz (0,01 M EDTA GVB⁺⁺)

200 ml Veronal 5x conc.
10 ml Gelatine (10%ig)
100 ml 0,1 M EDTA-Lösung

Zus. ad 1000 ml aqua bidest.

- Isotoner Gelatine/Veronalpuffer von halber Osmolalität (DGVB⁺⁺)

200 ml Veronal 5x conc.
10 ml Gelatine (10%ig)
10 ml 0,03 M CaCl₂-Lösung
10 ml 0,1 M MgCl₂-Lösung
50 g Glucose

Zus. ad 2000 ml aqua bidest.

Alle mit Gelatine hergestellten Puffer müssen täglich erneuert werden.

Durchführung:

- a) Herstellung einer standardisierten Hammelerythrocyten-suspension von 1×10^9 Zellen/ml nach der Methode von Rapp und Borsos (93)

- 10 ml Hammelblut werden 2x mit isotonischer Kochsalzlösung und anschließend 2x mit GVB⁺⁺ für 10 min. bei 3500 U/min. gewaschen.
- Die gewaschenen Hammelerythrocyten werden auf 50 ml mit GVB⁺⁺ resuspendiert.
- 1 ml dieser Erythrocytensuspension wird mit 25 ml aqua dest. lysiert und die Extinktion im Spektrophotometer bei der Wellenlänge von 541 nm bestimmt.

- Eine Extinktion von 0,42 entspricht der gewünschten Erythrocytenkonzentration von 1×10^9 Zellen/ml. Liegt die gemessene Extinktion höher als 0,42 wird das korrekte Endvolumen nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Endvolumen (ml)} = \frac{\text{gemessene Extinktion}}{0,42} \times 50 \text{ ml}$$

und die fehlende Menge GVB⁺⁺ zugesetzt.

b) Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Sensibilisierung der Erythrocyten für Komplement

- sämtliche Reaktionsmischungen werden doppelt angesetzt.
- Mit GVB⁺⁺ werden Hämolysinverdünnungen von 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 hergestellt.
- Meerscheinkenkomplement wird ebenfalls mit GVB⁺⁺ 1:100 verdünnt.
- 0,5 ml der hergestellten Hämolysinverdünnungen von 1:25 bis 1:800 werden mit 0,5 ml der standardisierten Erythrocytensuspension (1×10^9 Zellen/ml) für 10 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.
- danach werden 5,5 ml GVB⁺⁺ und 1 ml der Komplementverdünnung (1:100) zugegeben und die Mischung nochmals bei 37°C für 60 min. inkubiert.
- Folgende Ansätze dienen als Kontrollen:

	K'A	K'B	K'C
Erysuspension (ml)	0,5	0,5	0,5
Hämolysinverdünnung (ml) 1:25	0,5	---	---
	10 min. bei 37°C inkubieren; dann Zugaben von:		
GVB ⁺⁺ (ml)	6,5	6,0	---
H ₂ O	---	---	7,0
Komplementverdünnung 1:100 (ml)	---	1,0	---
	60 min. bei 37°C inkubieren.		

Kontrolle C entspricht 100 % Hämolyse; der Mittelwert der Kontrollen A und B gilt als Leerextinktion (unbeeinflussbare Spontanhämolyse);

- anschließend werden die Reaktionsmischungen für 10 min. bei 2500 U/min. zentrifugiert.
- Es folgt die photometrische Bestimmung der Extinktion des Überstands der zentrifugierten Reaktionsmischungen bei 541 nm; Nach Abzug der Leerextinktion wird der Hämolysegrad (%) berechnet:

$$\text{Hämolyse (\%)} = \frac{\text{Gemessene Extinktion-Leerextinktion}}{\text{K'C-Extinktion}}$$

Es ergaben sich folgende Werte nach Abzug der Leerextinktion:

Hämolysinverdünnung	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	K2
Extinktion bei 541 nm							
A	0,36	0,455	0,475	0,45	0,415	0,335	0,61
B	0,32	0,435	0,495	0,47	0,42	0,32	0,61
Hämolyse (%)							
A	59,0	74,6	77,9	73,8	68,0	54,9	-
B	52,5	71,3	81,1	77,0	68,9	52,5	-
Mittelwert	55,75	72,95	79,5	75,4	68,45	53,7	-

- Auf Milimeterpapier werden in der Ordinate die Hämolysewerte und in der Abszisse die entsprechenden Hämolysinverdünnungen der einzelnen Meßwerte eingetragen und die Punkte miteinander verbunden;
- Abb. 7 zeigt, daß hämolysinüberladene Erythrocyten relativ schlecht von Komplement lysiert werden können, da es zur Aggregation von antikörperbeschichteten Erythrocyten kommt, auf die das Komplement nicht einwirken kann (ansteigender Teil der Kurve). Die Kurve zeigt, daß eine optimale Sensibilisierung der Erythrocyten mit einer Hämolysinverdünnung von 1:100 erreicht wird, da hier die Hämolyse durch Meerschweinchenkomplement maximal ausgeprägt ist. Mit niedrigeren Hämolysinkonzentrationen nimmt die Lysierbarkeit der sensibilisierten Erythrocyten wieder ab, wie der absteigende Teil der Kurve in Abb. 7 zeigt, da in diesem Fall nicht alle Zellen mit Antikörpern beladen sind und daher auch nicht von Komplement lysiert werden können.

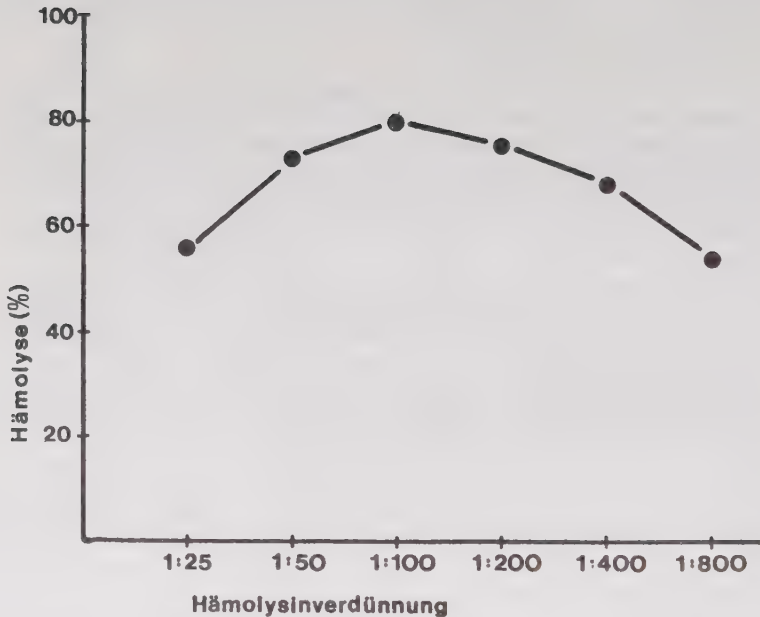


Abb. 7: Bestimmung der optimalen Hämolysinkonzentration für die Sensibilisierung der Schafererythrocyten. Gewählt wurde der Titer von 1:100.

c) Sensibilisierung der Hammelerythrocyten (EA)

- Die standardisierte Hammelerythrocytensuspension von 1×10^9 Zellen/ml wird 2x in GVB⁻ gewaschen und auf gleiches Volumen resuspendiert.
- Danach werden 50 ml der nach dem Vorversuch bestimmten optimalen Hämolysinverdünnung hergestellt, d.h. 1:100 in GVB⁺⁺.
- 50 ml der standardisierten Hammelerythrocytensuspension werden mit 50 ml Hämolysinverdünnung (1:100) gemischt und 30 min. bei 37°C inkubiert.
- Danach wird die Mischung für 10 min. bei 2500 U/min. zentrifugiert.

- Die Erythrocyten werden 2x mit DGVB⁺⁺ gewaschen und auf 50 ml Endvolumen resuspendiert.
- Die sensibilisierten Erythrocyten werden als "EA" bezeichnet.

d) Herstellung der Gebrauchslösung von EA

- Für die hämolytischen Komplementassays werden die sensibilisierten Erythrocyten in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml hergestellt. Dazu wird 1 Volumenteil (EA (1×10^9)) mit 9 Volumenteilen GVB⁺⁺ verdünnt (Ausgangsvolumen).
- Von dieser Verdünnung entnimmt man 0,5 ml und gibt sie zu 7 ml aqua dest.
- Dann wird die Extinktion dieser Lösung bei 414 nm photometrisch bestimmt.
- Um eine Erythrocytensuspension von 1×10^8 Zellen/ml zu erhalten, muß die Extinktion 0,6 betragen.
- Bei abweichenden Extinktionswert wird das Endvolumen der mit GVB⁺⁺ verdünnten EA entsprechend der Formel:

$$\text{Endvolumen (ml)} = \frac{\text{Ist-Extinktion (bei 414 nm)}}{\text{Soll-Extinktion (0,6)}} \times \frac{\text{Ausgangsvolumen (ml)}}{1}$$

korrigiert.

e) Durchführung der hämolytischen Komplementtitration

- Alle Reaktionsmischungen werden zur Ermittlung von Doppelwerten zweifach angesetzt und im Eisbad bei ca. $0-4^{\circ}\text{C}$ gekühlt.
- Zunächst werden 0,2 ml Serum mit GVB⁺⁺ auf 20 ml verdünnt (1:50 Verdünnung).

- Von jeder Serumprobe werden mit GVB⁺⁺ Verdünnungen von 1:100 bis 1:300 hergestellt. Die weitere Verdünnung ergibt sich aus folgendem Schema:

	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300
Serumverdünnung (ml) (1:50)	1	1	1	1	1
GVB ⁺⁺ (ml)	1	2	3	4	5

- 0,5 ml der standardisierten EA-Gebrauchslösung (1×10^8) werden mit jeweils 1 ml dieser Serumverdünnungen von 1:100 bis 1:300 gemischt. In jedes Röhrchen wird zusätzlich 1 ml GVB⁺⁺ pipettiert.
- Die Reaktionsmischungen werden dann bei 37°C für 60 min. in einem Schüttelwasserbad inkubiert.
- Anschließend gibt man zu jedem Ansatz 5 ml von 4°C kalter 0,9%iger NaCl-Lösung und zentrifugiert die Mischungen für 10 min. bei 2500 U/min.
- Die Ansätze der mitgeführten Kontrollen ergeben sich aus Tab. 2.
- Die Extinktion des Überstands der zentrifugierten Reaktionsmischungen wird bei 414 nm photometrisch gemessen.

Tab. 2: Versuchsansatz und Kontrollen zur hämolytischen Komplementtitration

Versuchsansatz	Kontrolle A (Spontanlyse)	Kontrolle B (100% Lyse)
0,5 ml EA (1×10^8 /ml in GVB ⁺⁺) + 1,0 ml Serumverdünnung (1:100 bis 1:300) + 1,0 ml GVB ⁺⁺	0,5 ml EA + 2,0 ml GVB ⁺⁺	0,5 ml EA + 7,0 ml H ₂ O
Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 60 min.		
danach: + 5,0 ml Na Cl (0,9%ig)	+ 5,0 ml NaCl (0,9%ig)	-----
Zentrifugation für 10 min. bei 2500 U/min.		
photometrische Messung der Extinktion bei 414 nm		

f) Auswertung der Meßergebnisse, dargestellt an einem Beispiel

- Es wurden folgende Extinktionen gemessen:

Serumverdünnung	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300	K'A	K'B
Extinktion bei A	0,560	0,390	0,180	0,072	0,040	0,010	0,600
OD414 B	0,565	0,395	0,175	0,079	0,042	0,010	0,600

- Nach Abzug der Leerkontrolle K'A (Spontanlyse) wird die Hämolyse (%) berechnet:

$$\text{Hämolyse (\%)} = \frac{\text{Gemessene Extinktion} - K'A\text{-Extinktion}}{K'B\text{-Extinktion}}$$

- Es ergeben sich folgende Hämolysewerte:

Serumverdünnung		1:100	1:150	1:200	1:250	1:300	K1	K2
Hämolyse (%)	A	91,67	63,33	28,33	10,33	5,00	--	--
	B	92,50	64,16	27,50	11,50	5,33	--	--

- Trägt man den Prozentsatz der hämolysierten Zellen gegen die zugegebene Menge Serum bzw. Komplement auf, so erhält man eine sigmoidale Dosis-Antwort-Kurve (siehe Abb. 8). Man sieht, daß die Hämolyse-Kurve asymptotisch gegen 100 % zuläuft. Aus diesem Grund ist es sinnvoller, das Komplement im Bereich des linearen Teils der Kurve zu titrieren. Dabei wird die Menge Komplement, die notwendig ist, eine 50%ige Hämolyse unter Standardbedingungen zu verursachen, als Referenzpunkt (CH50) gewählt.
- Das Verhältnis von % Hämolyse (y) und Komplementmenge (x) wird durch die Gleichung:

$$y = \frac{x^n}{x^n + K^n} \quad \text{ausgedrückt.}$$

- Aus dieser Formel leitet sich die van Krogh-sche Gleichung ab:

$$x = K \left(\frac{y}{1-y} \right)^{1/n}$$

bei der x die Komplementmenge, y die prozentuale Hämolyse, n eine Konstante, die die Neigung der Kurve bestimmt und K eine Konstante die die 50%-Einheit des Komplements wiedergibt, bedeuten.

- Besteht 50 % Lyse, so ist $y/1-y=1$ und x wird gleich K(CH50-Dosis).

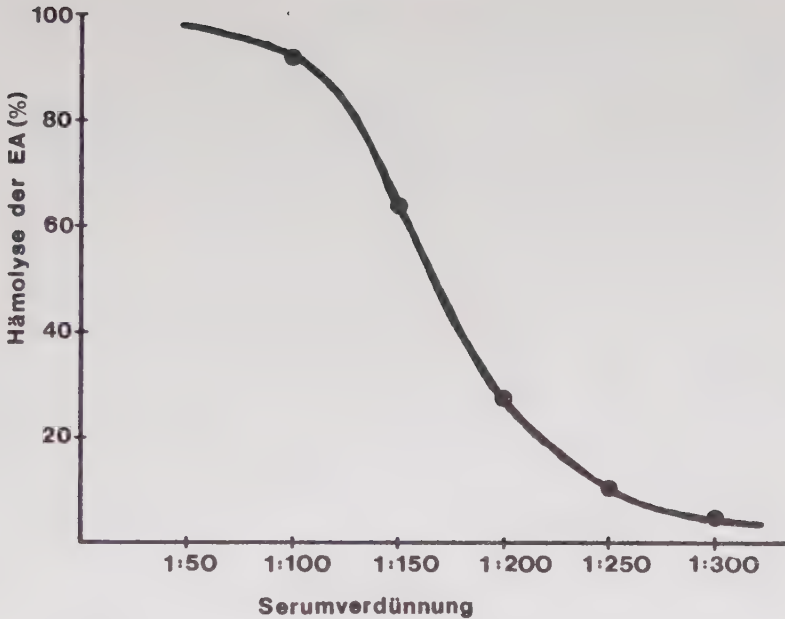


Abb. 8: Sigmoidale Dosis-Antwort-Kurve

- In unserem Beispiel erhält man folgende $y/1-y$ - Werte:

Serumverdünnung		1:100	1:150	1:200	1:250	1:300
$\frac{y}{1-y}$ Wert	A	11,00	1,73	0,395	0,115	0,053
	B	12,33	1,79	0,380	0,129	0,056

- In einem Graph wird nun $\log$ -Serumverdünnung auf der Ordinate und $\log y/1-y$ auf der Abszisse gegeneinander aufgetragen, sodaß man eine Gerade nach der Gleichung:

$$\log x = \log K + 1/n \log (y/1-y) \quad \text{erhält (siehe Abb. 9)}$$

- x entspricht der Komplementmenge.

- Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Ordinate ($x=0$) gibt die Serumverdünnung an, die einer CH50-Einheit entspricht, wenn $\log (y/1-y)=0$, $y=0,5$ beträgt.
- In unserem Beispiel (Abb. 9) erhält man einen Wert von 170 CH50/ml, d.h. bei einer Serumverdünnung von 1:170 werden 50 % der standardisierten Menge von sensibilisierten Erythrocyten lysiert.

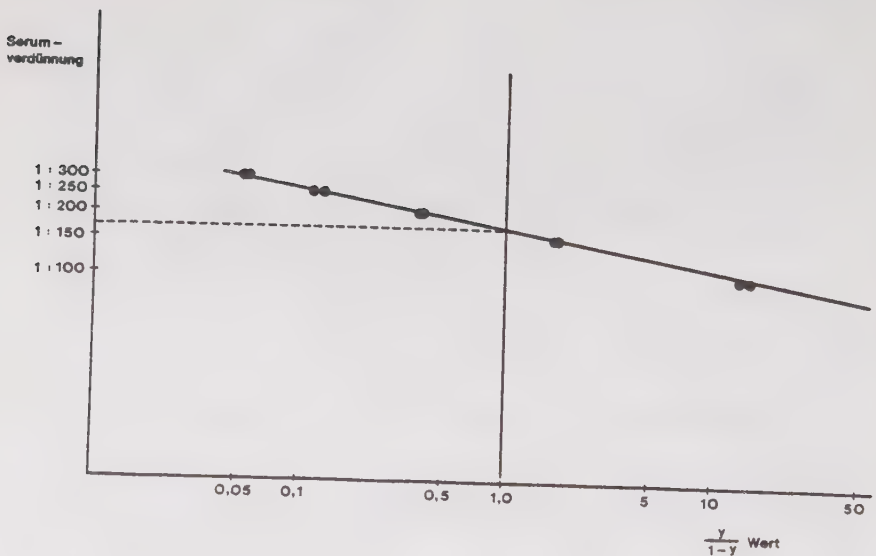


Abb. 9: Dosis-Antwort-Kurve zur Bestimmung der Komplementkonzentration: $\log$ Serumverdünnung gegen $\log (y/1-y)$, wobei y =Hämolyse (%). In diesem Beispiel erhält man einen Wert von 170 CH50-Einheiten.

Methode 2: Zweidimensionale Immunelektrophorese (CIEP)

Prinzip (vgl. Abb. 10)

Die nach Laurell modifizierte zweidimensionale Immunelektrophorese (58) wurde in dieser Arbeit zum Nachweis von Spaltprodukten der Komplementkomponente C3, insbesondere des C3c-Bruchstücks, verwendet. Im ersten Arbeitsgang wird das Serum elektrophoretisch aufgetrennt. Das leichtere C3c-Spaltprodukt wandert im elektrischen Feld schneller als das ungespaltene C3-Nativmolekül. Im zweiten Arbeitsgang werden die aufgetrennten C3-Fractionen im 90° Winkel zur ersten Wanderungsrichtung durch ein Agarosegel geleitet, in das ein spezifisches Anti-C3c-Serum inkorporiert ist. In der Äquivalenzzone kommt es zur Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, deren Präzipitationslinien sich mit einem Farbstoff - dem Coomassie Blue - anfärben lassen. Sie zeigen semiquantitativ die Größe der C3-Spaltung (%) an, wenn man die planimetrisch berechnete Gesamtfläche in Beziehung zu der Fläche des anodenwärts gelegenen Präzipitats setzt.

Material:

- LKB 2103 Powersupply
- LKB 2117 Multiphor, Elektrophoresekammer
- LKB 2209 Multitemp, Kühlaggregat
- Planimetrieapparat: MOP-AMU 3, Kontron Meßgeräte GmbH
- Oxford Sampler Micropipetting System, US Pat.Nr. RE 27637
- Filterwatte, extrafein, Hecht Nr. 1408/2
- Whatman Filterpapier 104x253 mm, Grade 1
- Agarose ME Seakem, EEO ($-m_r$): 0,16-0,19; Lot.Nr. 60560
- Rabbit immunoglobulins to human C3c-Complement; DAKO immunoglobulins a/s; Vertrieb durch Boehringer Ingelheim Diagnostika
- Titriplex III, Merck, Art.Nr. 8418 = EDTA
- 5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz, Merck, Art.Nr. 6318
- 5,5 Diäthylbarbitursäure, Merck, Art.Nr. 276
- Coomassie Brilliant Blue, rein, C.T. 42660

Verwendete Puffer und Lösungen:

- EDTA barbitalpuffer (4 x conc.) = Stammlösung

5,95 g EDTA
5,45 g 5,5 Diäthylbarbitursäure
37,92 g 5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz

Zus. ad 2000 ml aqua dest.

- EDTA-barbitalpuffer = Gebrauchslösung:

500 ml Stammlösung wird mit 1500 ml aqua dest. gemischt;
Der pH-Wert wird auf 8,6 (bei 20°C) mit NaOH oder HCl
eingestellt.

- Herstellung einer Hämoglobinlösung als Markersubstanz für die Elektrophorese:

Hammelblut Behring wird 3x in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und auf gleiches Volumen mit aqua dest. aufgefüllt bzw. lysiert. Die Lösung wird für 20 min. bei 4000 U/min. zentrifugiert und der Überstand als Markersubstanz benutzt;

- Coomassie Blue-Färbelösung:

5 Teile Methylalkohol
5 Teile H₂O
1 Teil Essigsäure

In 500 ml dieser Lösung werden 250 mg Coomassie blue gelöst, was einer 0,05%igen Lösung entspricht;

- Entfärbelösung: wie oben, aber ohne Farbstoff

- Agaroselösung 1%ig:

1 g Agarose wird vorsichtig zu 100 ml EDTA-barbitalpuffer im Erlenmeyerkolben gegeben und im kochenden Wasserbad so lange erhitzt bis sie vollständig gelöst ist. Auf jeden Fall ist wiederholtes und zu langes Erwärmen zeitlich zu begrenzen, um eine Hydrolyse oder Karamelisierung zu vermeiden. Die noch heiße Agarlösung läßt man vor dem Gießen

durch Filterwatte passieren, um Verunreinigungen und nicht gelöste Teilchen zu entfernen.

- Herstellung von Gelplatten:

Diagläser von 5x5 cm Größe werden mehrere Tage in einer Waschlösung (Aceton und Äthanol im Verhältnis 1:1) entfettet und sorgfältig getrocknet. Zur besseren Haftfähigkeit des Gels auf dem Glas werden die Glasplatten vorbe-schichtet, wobei ein Tropfen der Agarlösung in der Art eines Blutausstrichs über die gesamte Oberfläche verteilt wird. Die Platten werden mit einem Ventilator auf einem Nivelliertisch getrocknet. Die vorbe-schichteten Glasplatten werden anschließend mit 3,3 ml Agar beschichtet, wobei die Agarlösung möglichst luftblasenfrei über die gesamte Fläche (25 cm^2) verteilt wird. Nach Erkalten werden die hergestellten Gelplatten in einer feuchten Kammer bei 4°C aufbewahrt. Vor Versuchsbeginn werden zwei im Durchmesser 3 mm große Einfülllöcher in den Agar der Gelplatte gestanzt, die jeweils 4 mm von den beiden Außenkanten und 4 mm von der Unterkante der Platte entfernt sind (siehe Abb. 10a).

Durchführung:

a) 1. Dimension (vgl. Abb. 10a)

- Die Elektrophorese wird in einer LKB-Elektrophoresekammer mit EDTA-barbitalpuffer (pH Wert = 8,6) durchgeführt. Der Puffer wird mit dem LKB-Kühlaggregat bei einer Temperatur von $8-10^\circ\text{C}$ gehalten und nach jeder Elektrophorese erneuert.
- 4 Gelplatten werden auf gleicher Höhe und in gleichem Abstand auf die Kühlplatte der Kammer gelegt.
- Der Kontakt zwischen Pufferlösung und Agarplatten wird durch zwei saugfähige Kunstfasertücher hergestellt, die von Ober- und Unterkante der Gelplatten bis in die Pufferlösung hineinreichen.
- 5 μl Serum wird in das linke ausgestanzte Loch aufgetragen.
- In das rechte Reservoir wird das gleiche Volumen des Hämoglobinmarkers gegeben.

- An Hand des Markers kann die Wanderungsgeschwindigkeit der Serumproteine im elektrischen Feld sichtbar gemacht werden. Unmittelbar nach Probenauftragung wird die Elektrophorese begonnen. Sie wird in der 1. Dimension bei einer Spannung von 200 V mit einer Stromstärke von 35 mA durchgeführt.
- Die 1. Dimension ist beendet, wenn der Hämoglobinmarker etwa die Hälfte der Geldplatten durchlaufen hat, was ca. 2-2 1/2 Stunden in Anspruch nimmt.

b) 2. Dimension (vgl. Abb. 10b)

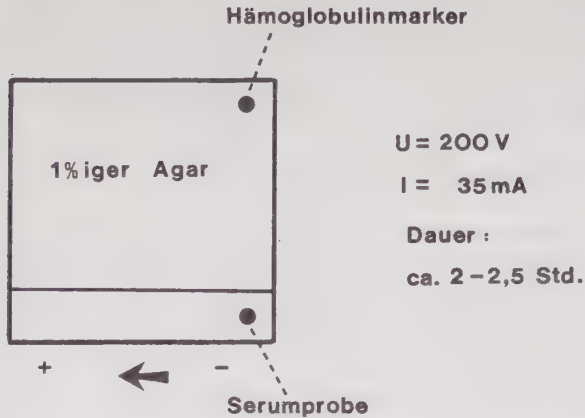
- Nach Beendigung der 1. Dimension werden die Gelplatten so präpariert, daß nur ein 1 cm breiter Gelstreifen, der die elektrophoretisch aufgetrennten Serumbestandteile enthält, belassen wird. Die übrige Agarfläche wird mit einem Skalpell abgetrennt und vorsichtig entfernt.
- 2,75 ml der 1%igen Agaroselösung werden in einem Reagenzglas sorgfältig mit 25 µl des vorgesehenen Antiserums (in unserem Falle AntiC3c) vermischt, wobei die Temperatur der Agaroselösung unter 56°C gehalten werden muß, um eine Denaturierung des Antiserums zu verhindern.
- Anschließend wird mit diesem Gemisch die freie Oberfläche der präparierten Gelplatte beschichtet.
- Nach Erstarren der Agarschicht werden die Gelplatten in der Kammer so plaziert, daß die Wanderungsachse einen 90° Winkel zu der 1. Dimension einnimmt.
- Die 2. Dimension wird bei einer Spannung von 50 V und einer Stromstärke von 8-9 mA durchgeführt. Die Laufzeit beträgt 12-16 Stunden.

c) Pressen, Trocknen und Färben der Gelplatten

- Nach Ablauf der 2. Dimension werden die Gelplatten für 30 min. in 0,9%iger NaCl-Lösung und 15 min. in aqua dest. gespült, um nicht präzipitierte Serumproteine zu entfernen.
- Dann werden die Gelplatten mit feinem, angefeuchtetem Filterpapier und mit 8-10 Lagen von gefalteten Papiertüchern bedeckt und durch Auflage einer nicht zu schweren Metallplatte gepreßt.

- Dieser Preßvorgang wird nach ca. 15 min. von einer erneuten Inkubation der Gelplatte in 0,9%iger NaCl-Lösung und anschließendem 15-minütigen Spülen in aqua dest. unterbrochen und ein zweites Mal durchgeführt.

a)



b)

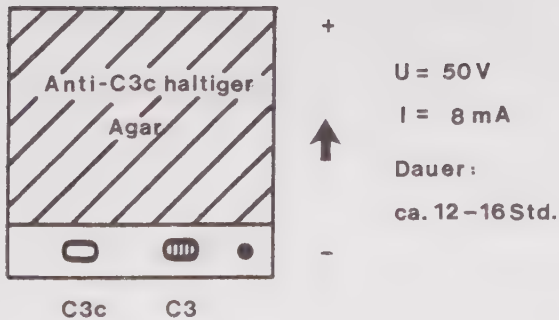


Abb. 10: Prinzip der zweidimensionalen Immunelektrophorese (CIEP)

- elektrophoretische Auftrennung der Serumbestandteile (1. Dimension)
- Immundiffusion der aufgetrennten Serumbestandteile in ein Anti-C3c-haltiges Gel (2. Dimension)

- Schließlich werden die gepreßten Gelplatten mit einem Ventilator getrocknet und in einer 0,05%igen Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung für ca. 5-15 min. gefärbt.
- Nichtproteingebundener Farbstoff wird durch eine ca. 5 minütige Inkubation in der Entfärbelösung (siehe Material) entfernt.
- Jetzt sind nur noch die angefärbten Präzipitationslinien sichtbar.
- Nach Trocknung werden die gefärbten Präparate beschriftet und gerahmt.

d) Auswertung der Meßergebnisse

- Die Auswertung dieser Methode soll an Hand von zwei Versuchen demonstriert werden. Als Serumproben dienen

- 1.) frisches Normalserum und
- 2.) mit Zymosan vorbehandeltes Normalserum.

Zur Herstellung des vorbehandelten Serums wurde 10 mg Zymosan (von *Saccharomyces cerevisiae* der Firma Sigma Chemical Company, Best.Nr. Z 4250) mit 1 ml Serum für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Serum für 10 min. bei 2500 U/min. zur Entfernung der Bierhefepartikel zentrifugiert. Zymosan, ein Polysaccharid, führt zur Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems und zur vollständigen proteolytischen Spaltung von C3 (29, 60, 90).

- Ist die C3 Komplementkomponente ungespalten wie in frischen Normalserum, so bildet sich in der CIEP nur ein Präzipitationsgipfel, der relativ weit kathodenwärts liegt (siehe Abb. 11a).
- Mit dem Zymosan-vorbehandelten Normalserum, das nur Spaltprodukte von C3 (C3c und C3d) enthält, zeigt sich in der CIEP ein viel weiter anodenwärts gelegener Gipfel in Anti-C3-haltigem Gel, der die C3c-Spaltprodukte repräsentiert (siehe Abb. 11b). Aufgrund ihrer kleineren Molekülgröße wandern sie während der Auftrennung schneller als das native C3-Molekül.

- Die Versuchsergebnisse werden zeigen, daß in den meisten Fällen der aufgetrennten Seren sowohl natives C3 als auch seine C3c-Spaltprodukte vorhanden sind, sodaß sich in der CIEP zwei Gipfel ausprägen (siehe Abb. 11c). Das Ausmaß der C3-Spaltung wächst mit dem anodenwärts gelegenen Gipfel. Das Verhältnis zwischen gespaltenen und ungespaltenen Molekül wurde semiquantitativ berechnet, indem die Gesamtfläche des Präzipitats mit der Fläche des kleineren anodenwärts gelegenen Gipfels in ein Verhältnis gesetzt wurde (vgl. Abb. 12). Die Berechnung der Flächen erfolgte planimetrisch mit dem MOP-AMO 3.

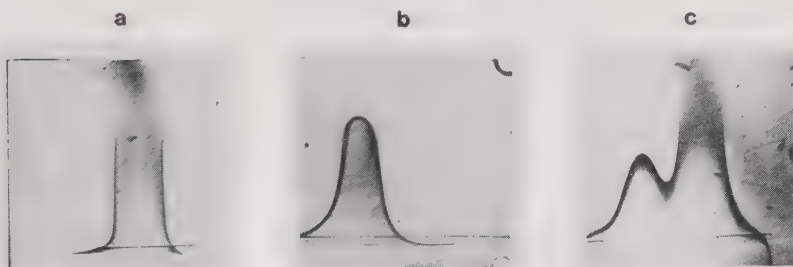


Abb. 11: Zweidimensionale Immunelektrophorese mit Anti-C3c-Serum

- a) unbehandeltes Normalserum
- b) mit Zymosan vorbehandeltes Normalserum
- c) bestrahltes Patientenserum:
der kathodenwärts gelegene Gipfel repräsentiert das ungespaltene C3 und der anodenwärts gelegene Gipfel das C3c-Spaltprodukt.

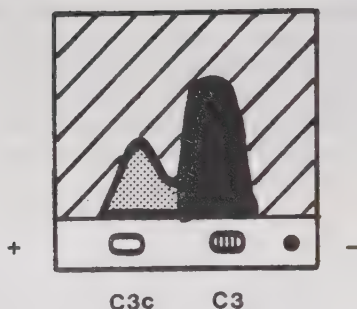


Abb. 12: Die Abbildung illustriert die semiquantitative Bestimmung der C3-Spaltung. Der anodenwärts gelegene Gipfel stellt den Anteil der C3c-Spaltprodukte dar (▨). Der kathodenwärts gelegene Gipfel stellt den Anteil des nativen, ungespaltenen C3-Moleküls dar (■).

Beispiel:

- planimetrisch gemessene Fläche des Gesamtpräzipitats = 380 mm².
- planimetrisch gemessene Fläche des anodenwärts gelegenen Gipfels = 90 mm².

$$\text{C3-Spaltung (\%)}: \frac{90}{380} \times 100 = 25 \%$$

Methode 3: Radiale Immundiffusion

Prinzip:

Die einfache Immun-Gel-Diffusionsmethode nach Mancini (70) dient zur quantitativen Bestimmung eines speziellen Proteins in einem zusammengesetzten Eiweißgemisch. Das zu bestimmende Antigen, in diesem Fall C3 oder C4, diffundiert radial vom Auftragsort in das umgebende, gleichmäßig dicke Gel, das den korrespondierenden Antikörper in homogener Verteilung enthält. Dabei kommt es zur Ausbildung eines ringförmigen Immunpräzipitats unter Verbrauch der sich unmittelbar an der Auftragsstelle im Agar befindlichen Antikörper. Der Endpunkt der Diffusion ist in der Äquivalenzzone erreicht, in dem das vorgelegte Antigen alle zur Verfügung stehenden Antikörper gebunden hat. Zwischen der Konzentration des Antigens und dem Quadrat des Ringdurchmessers besteht eine direkte, lineare Proportionalität.

Material: M-Partigen^R-Testzubehör (Behring)

Durchführung:

Die Bestimmung wurde nach den Angaben der Firma Behring durchgeführt. In drei Standardseren mit bekannten Proteinkonzentrationen von C3 und C4 wurden folgende Werte gemessen:

	Protein-Standard-Serum		
	mg/100 ml	D (mm)	D ² (mm ²)
Lösung I	11	4,50	20,25
Lösung II	22	5,45	29,70
Lösung III	44	7,00	49,00

Auswertung:

Für die Auswertung der Serumproben wurde eine Eichkurve erstellt, indem die quadrierten Durchmesser (D²) der Stan-

dardpräzipitate in der Ordinate als Funktion der bekannten C3 und C4-Konzentrationen in den drei Standardseren (Abszisse) aufgetragen wurden (siehe Abb. 13). Es resultierte eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Ordinate bei $11 \pm 2,5 \text{ mm}^2$ lag. Die C3 bzw. C4-Konzentrationen der Serumproben wurden auf der erstellten Bezugskurve abgelesen und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

Beispiel:

- D für Probanden-Serumverdünnung 1:2 ist 5,7 mm.
- D^2 beträgt folglich $32,49 \text{ mm}^2$
- Aus der Bezugskurve (siehe Abb. 13) wird für D^2 ($32,49 \text{ mm}^2$) eine C3 Konzentration von $25 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ermittelt.
- Nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors von 1:2 ergibt sich eine C3-Konzentration von $2 \times 25 \text{ mg}/100 \text{ ml}$, d.h. $50 \text{ mg}/100 \text{ ml}$.

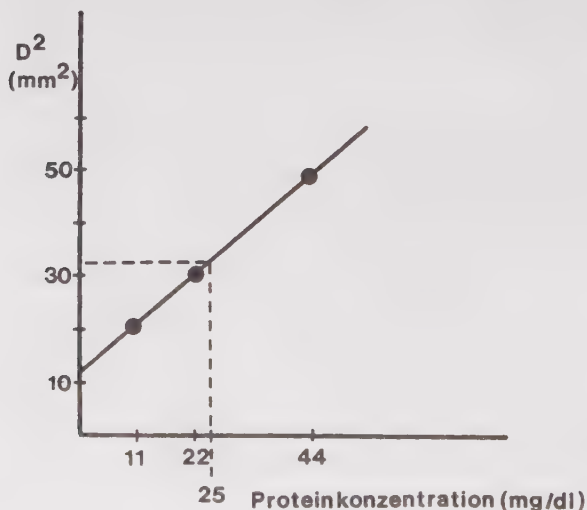


Abb. 13: Eichkurve zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen von C3 und C4 in den Probandenseren

3.2. Phototoxische Komplementaktivierung in Normalserum nach Zusatz von photoaktiven Substanzen

Material:

- Uroporphyrin III - Octomethylester der Firma Sigma Chemie Best.Nr. U 2877 (Absorptionsspektrum siehe Abb. 2)
- Chloroquin (Resochin^R), Firma Bayer
- EDTA, (Titriplex III, Merck)
- EDTA (Äthylenglykol bis (2 aminoäthyläther) N, N-tetra-essigsäure), Serva, Heidelberg
- Carotaben (beta-Carotin), Hermal Chemie

Verwendete Puffer und Lösungen:

- 0,2 M EGTA-Lösung:
3,8 g EGTA werden in 40 ml aqua dest. unter Zugabe von 5 ml NaOH unter Erhitzen gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 1n-HCl auf 7,2 eingestellt und aqua dest. zugegeben bis ein Endvolumen von 50 ml erreicht war.
- 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung
- EGTA/ Mg^{2+} -Gebrauchslösung:
10 ml 0,2 M EGTA-Lösung wurden mit 10 ml 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung gemischt.
- PBS-Puffer (0,01 M) nach Nairn:
1,07 g Na_2HPO_4 (ohne H_2O)
0,39 g $NH_2PO_4 \times 2 H_2O$
8,5 g NaCl

Zus. ad 1 l aqua bidest. und pH-Wert auf 7,1 einstellen.

- 0,3 M EDTA-Lösung:
11,27 g EDTA werden in 100 ml H_2O gelöst;

- Uroporphyrin III-Stammlösung:
1 mg Uroporphyrin III wurde in 10 ml PBS-Puffer (im abgedunkelten Raum unter Rotlicht!) zur Herstellung einer Stammlösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml Uroporphyrin gelöst.
- beta-Carotin-Stammlösung:
Zur Herstellung der Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde der Inhalt einer Kapsel Carotaben (25 mg) in 25 ml PBS-Puffer gelöst.
- Chloroquin-Stammlösung:
100 mg Chloroquin wurden in 20 ml PBS-Puffer zur Herstellung einer Stammlösung von 5 mg/ml gelöst.

Zusatz von Uroporphyrin

- alle Arbeiten mit Uroporphyrin wurden im Dunkeln bei Rotlichtbeleuchtung ausgeführt.
- Herstellung einer Reihen-Verdünnung (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32) aus der Uroporphyrin III-Stammlösung mit PBS-Puffer.
- 0,1 ml der Stammlösung bzw. der Reihen-Verdünnungen von 1:12 bis 1:32 wurden mit jeweils 0,9 ml Normalserum sorgfältig gemischt. Die Uroporphyrinendkonzentrationen in den Serumproben betrugen somit: 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62 und 0,31 µg Uroporphyrin pro ml.
- Die derart vorbehandelten Seren wurden in gleicher Weise wie die Patientenserum mit UVA-Dosen von 10 und 50 J/cm² bestrahlt (siehe Kap. 3.1.2.). Die Veränderungen der Gesamtkomplementaktivität (CH50) und der C3-Spaltung wurden mit den in Kap. 3.1.3. erläuterten Methoden bestimmt.
- Als Kontrollen dienten:
 1. 1 ml Normalserum mit 10 µg Uroporphyrin, das während der Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA lichtgeschützt war.
 2. 0,9 ml Normalserum mit 0,1 ml PBS-Puffer ohne Uroporphyrinzusatz, das mit 50 J/cm² UVA bestrahlt wurde.
 3. 1 ml unbestrahltes Normalserum ohne Uroporphyrin.

3.2.2. Zusatz von vorbestrahlten Uroporphyrin

- Bei diesem Versuch wurde die Uroporphyrin III-Stammlösung (100 ug/ml) mit 100 J/cm² UVA vorbestrahlt.

1. 0,9 ml Normalserum mit 0,1 ml der vorbestrahlten Uroporphyrin-Stammlösung und
2. 0,9 ml Normalserum mit 0,1 ml einer unbestrahlten Uroporphyrin-Stammlösung vermischt und mit 50 J/cm² UVA bestrahlt.

Als Kontrolle diente:

- 0,9 ml Normalserum mit 0,1 ml PBS-Puffer (ohne Uroporphyrin), das gleichermaßen mit 50 J/cm² UVA bestrahlt wurde.

Die folgenden Kontrollansätze wurden während der Bestrahlung vor Licht geschützt:

- 0,9 ml Normalserum mit 0,1 ml vorbestrahlter Uroporphyrin-Stammlösung
- 0,9 ml Normalserum mit 0,1 ml unbestrahlter Uroporphyrin-Stammlösung.

In sämtlichen Serumproben wurde die hämolytische Gesamtkomplementaktivität und das Ausmaß der C3-Spaltung gemessen.

3.2.3. Einfluß von Chelatbildnern (EGTA/Mg²⁺ und EDTA) auf die phototoxische Komplementaktivierung

- Zunächst wurden Seren mit einer Endkonzentration von 1,25 und 10 ug Uroporphyrin/ml hergestellt.

- Folgende Ansätze wurden gewählt:

1. 0,9 ml Normalserum mit 1,25 bzw. 10 ug Uroporphyrin und mit 0,1 ml der 0,1 M EGTA/Mg²⁺-Lösung, sodaß eine Endkonzentration von 10 mmol EGTA/Mg²⁺ im Serum entstand.
2. 0,9 ml Normalserum mit 1,25 und 10 ug Uroporphyrin und mit 0,1 ml der 0,3 M EDTA-Lösung, sodaß im Serum eine Endkonzentration von 30 mmol EDTA entstand.

3. 1,0 ml Normalserum mit 1,25 bzw. 10 ug Uroporphyrin ohne weitere Zusätze.

- Als Kontrollen dienen:

0,9 ml Normalserum mit 0,1 ml der 0,1 M EGTA/ Mg^{2+} -Lösung

0,9 ml Normalserum mit 0,1 ml der 0,3 M EDTA-Lösung

Alle oben aufgeführten Serumproben wurden mit 50 J/cm² UVA bestrahlt. Eine weitere Kontrolle wurde während der Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA lichtgeschützt:

- 1 ml Normalserum mit 10 ug Uroporphyrin ohne weiteren Zusatz.

In allen Serumproben wurde mittels CIEP das Ausmaß der C3-Spaltung berechnet.

3.3. Effekt therapeutisch wirksamer Substanzen auf die phototoxische Komplementaktivierung

3.3.1. Beta-Carotin

Zunächst wurden Seren mit einer Endkonzentration von 1,25 ug Uroporphyrin/ml hergestellt.

Zu jeweils 1 ml dieser uroporphyrinhaltigen Seren wurden 10 bzw. 20 ul der beta-Carotin-Stammlösung gegeben, um die gewünschte Konzentration von 10 bzw. 20 ug/ml Serum zu erhalten.

Folgende Kombinationen wurden gewählt:

1. 1 ml Normalserum mit 1,25 ug Uroporphyrin und mit 10 bzw. 20 ug beta-Carotin.
2. 1 ml Normalserum mit 1,25 ug Uroporphyrin ohne beta-Carotin.

Als Kontrolle diente:

- 1 ml Normalserum ohne Uroporphyrin, aber mit 20 ug beta-Carotin.

Sämtliche oben genannten Serumproben wurden mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt.

Als weitere Kontrolle diente:

- 1 ml unbestrahltes Normalserum ohne Uroporphyrinzusatz.
- 1 ml Normalserum mit $1,25 \text{ ug}$ Uroporphyrin, das während der Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA lichtgeschützt war.

In allen Serumproben wurde mittels CIEP das Ausmaß der C3-Spaltung bestimmt.

3.3.2. Chloroquin

Zunächst wurden Seren mit einer Endkonzentration von $0,62$ und $1,25 \text{ ug}$ Uroporphyrin/ml hergestellt. Zu jeweils $0,9 \text{ ml}$ dieser uroporphyrinhaltigen Seren wurde $0,1 \text{ ml}$ der Chloroquin-Lösung gegeben, um eine Konzentration von ca. 500 ug Chloroquin/ml Serum zu erhalten.

Folgende Ansätze wurden hergestellt:

1. 1 ml Normalserum mit $0,62$ bzw. $1,25 \text{ ug}$ Uroporphyrin und mit 500 ug Chloroquin.
2. 1 ml Normalserum mit $0,62$ bzw. $1,25 \text{ ug}$ Uroporphyrin ohne Chloroquin.

Als Kontrollen dienten:

- 1 ml Normalserum ohne Uroporphyrin, aber mit 500 ug Chloroquin.
- 1 ml Normalserum ohne Zusätze

Alle oben aufgeführten Serumproben wurden mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt.

Die folgenden Kontrollen wurden während der Bestrahlung vor Licht geschützt:

- 1 ml Normalserum mit $1,25 \text{ ug}$ Uroporphyrin und mit 500 ug Chloroquin sowie
- 1 ml Normalserum mit $1,25 \text{ ug}$ Uroporphyrin ohne Chloroquin.

In einem weiteren Versuchansatz wurden 1,25 ug Uroporphyrin zu 1 ml Serum gegeben, das von einem Patienten stammte, der wegen eines diskoiden Lupus erythematodes unter einer mehrwöchigen Therapie in einer Dosierung von 500 mg Chloroquin pro Tag stand. Als Kontrolle diente Serum des gleichen Patienten 6 Wochen nach Absetzen der Therapie mit und ohne Uroporphyrinzusatz.

Nach Bestrahlung aller Serumproben mit 50 J/cm^2 UVA wurde mittels CIEP die C3-Spaltung gemessen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Veränderungen der hämolytischen Komplementaktivität in PCT-Seren nach UVA-Bestrahlung

In Tab. 3 sind die Veränderungen der hämolytischen Komplementaktivität in den 14 Patientenseren und in Tab. 4 in den 6 Normalseren nach Bestrahlung mit 5,10 und 50 J/cm² UVA einschließlich der Kontrollen zusammengestellt. Angegeben sind die absoluten CH50-Werte in Einheiten/ml sowie die Abnahme der Komplementaktivität in CH50-Einheiten bzw. in Prozent des Ausgangswertes (Kontrolle 2). Man sieht:

a) Die Komplementaktivität der unbestrahlten Serumproben des Normalkollektivs (Kontrolle 1) schwankte zwischen 170 und 210 CH50-Einheiten.

Die Komplementaktivität der unbestrahlten Serumproben der PCT-Patienten (Kontrolle 1) betrug durchschnittlich 183 CH50-Einheiten. 2 Patienten wiesen verglichen mit dem Normalkollektiv, eine Hyperkomplementämie von 240 CH50-Einheiten auf.

b) In den Patientenseren, die während der Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA lichtgeschützt waren (Kontrolle 2) kam es gegenüber den unbestrahlten Kontrollen (Kontrolle 1) zu einem geringgradigen Abfall von CH50 von durchschnittlich 16 Einheiten (8,8 %).

Auch in den lichtgeschützten Seren der Normalpersonen (Kontrolle 2) fand sich ein vergleichbarer Abfall der hämolytischen Aktivität von 11 CH50-Einheiten (5,9 %). Während des Versuchsablaufs tritt offenbar in den lichtgeschützten Kontrollen eine geringgradige, nicht phototoxisch bedingte Komplementaktivierung ein, die vermutlich auf die Wärmeentwicklung während der Bestrahlung zurückgeführt werden kann. Daher wurde der CH50-Wert von der, während der Bestrahlung lichtgeschützten Kontrolle (Kontrolle 2) als Ausgangswert genommen und mit 100 % angesetzt.

Tab. 3.: Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität in den 14 Patientenseren nach Bestrahlung mit 5,10 und 50 J/cm² UVA.

Kontrolle 1: unbestrahltes Serum

Kontrolle 2: während der Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA vor Licht geschütztes Serum.

PCT-Patienten:

Serum-Nr.	Messwerte nach Bestrahlung mit			Kontr.	Kontr.
	5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²	1	2
1	CH50	120	110	90	175
	Δ CH50	20	30	50	---
	Abnahme %	14,3	21,4	35,7	---
2	CH50	160	150	135	175
	Δ CH50	5	15	30	---
	Abnahme %	3,0	9,1	18,2	---
3	CH50	125	115	60	170
	Δ CH50	25	35	90	---
	Abnahme %	16,7	23,3	60,0	---
4	CH50	135	120	85	150
	Δ CH50	0	15	50	---
	Abnahme %	0	11,1	37,0	---
5	CH50	150	150	110	180
	Δ CH50	20	20	60	---
	Abnahme %	11,8	11,8	35,3	---
6	CH50	145	135	105	150
	Δ CH50	5	15	45	---
	Abnahme %	3,3	10,0	30,0	---
7	CH50	160	150	125	195
	Δ CH50	0	10	35	---
	Abnahme %	0	6,3	21,9	---
8	CH50	180	155	130	200
	Δ CH50	20	45	70	---
	Abnahme %	10,0	22,5	35,0	---

Serum-Nr.	Messwerte nach Bestrahlung mit			Kontr.	Kontr.
	5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²	1	2
9	CH50	220	215	190	240
	Δ CH50	10	15	40	---
	Abnahme %	4,3	6,5	17,4	---
10	CH50	150	140	130	165
	Δ CH50	5	15	25	---
	Abnahme %	3,2	9,7	16,1	---
11	CH50	125	120	102	150
	Δ CH50	15	20	38	---
	Abnahme %	10,7	14,3	27,1	---
12	CH50	200	190	175	240
	Δ CH50	0	10	25	---
	Abnahme %	0	5,0	12,5	---
13	CH50	150	140	125	170
	Δ CH50	0	10	25	---
	Abnahme %	0	6,7	16,7	---
14	CH50	185	170	145	200
	Δ CH50	5	20	45	---
	Abnahme %	2,6	10,5	23,7	---

c) In 10 der 14 Patientenseren trat bereits nach 5 J/cm² UVA eine Abnahme der Komplementaktivität von 2,6 bis 16,7 % ein. Dagegen war in 4 Patientenseren und in keinem der Normalseren nach Bestrahlung mit 5 J/cm² UVA ein Abfall von CH50 messbar.

d) Nach der Bestrahlung mit 10 J/cm² UVA fiel die Komplementaktivität in allen Patientenseren ab. Die Werte lagen zwischen 5,0 und 23,3 %. Allerdings war auch in 4 der 6 Normalseren nach dieser Bestrahlungsdosis eine geringe CH50-Abnahme messbar (2,5-6,3 %).

Tab. 4: Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität in den 6 Normalseren nach Bestrahlung mit 5,10 und 50 J/cm² UVA.

Kontrolle 1: unbestrahltes Serum

Kontrolle 2: während der Bestrahlung mit 50 J/cm² lichtgeschütztes Serum.

Normalkollektiv:

Serum-Nr.	Messwerte nach Bestrahlung mit			Kontr.	Kontr.
	5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²	1	2
1	CH50 160	160	130	175	160
	Δ CH50 0	0	30	---	---
	Abnahme % 0	0	18,8	---	---
2	CH50 175	165	155	175	175
	Δ CH50 0	10	20	---	---
	Abnahme % 0	5,7	11,4	---	---
3	CH50 195	190	180	200	195
	Δ CH50 0	5	15	---	---
	Abnahme % 0	2,5	7,6	---	---
4	CH50 150	150	135	170	150
	Δ CH50 0	0	15	---	---
	Abnahme % 0	0	10,0	---	---
5	CH50 160	150	140	170	160
	Δ CH50 0	10	20	---	---
	Abnahme % 0	6,3	12,5	---	---
6	CH50 195	185	175	210	195
	Δ CH50 0	10	20	---	---
	Abnahme % 0	5,1	10,3	---	---

e) Noch ausgeprägter war die Abnahme der hämolytischen Komplementaktivität in allen Patientenseren nach der Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA. Die prozentuale Abnahme von CH50 lag zwischen 12,5 und 60 %. In den Normalseren dagegen nur zwischen 7,6 und 18,8 %.

Das Ausmaß der phototoxischen Komplementaktivierung wurde anschließend in den drei Patientengruppen (1. bei unbehandelten Patienten, aktives Krankheitsstadium; 2. bei unbehandelten Patienten in klinischer Remission; 3. bei behandelten Patienten) verglichen. Tab. 5 zeigt, daß die Abnahme der hämolytischen Komplementaktivität in den 3 Patientengruppen unterschiedlich ausgeprägt war.

In den Seren der unbehandelten Patienten fiel die hämolytische Aktivität nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA mit durchschnittlich 37,2 % am stärksten ab. In den Seren der behandelten Patienten war die Abnahme von CH50 nach der gleichen Bestrahlungsdosis mit 26,1 % weniger stark ausgeprägt. Der geringste Abfall mit 19,2 % zeigte sich in den Seren der in Remission befindlichen Patienten mit inaktiver PCT. Doch lag der prozentuale CH50-Abfall in dieser Gruppe immer noch signifikant über demjenigen der Normalpersonen mit durchschnittlich 11,8 %.

Tab. 5: Plasmaporphyrinkonzentrationen ($\mu\text{g/dl}$) und Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität in den einzelnen Patientengruppen (1. bei unbehandelten Patienten, aktives Stadium, 2. bei unbehandelten Patienten in klinischer Remission und 3. bei behandelten Patienten) und im Normalkollektiv.

x = Mittelwert

s = Standardabweichung

1. Unbehandelte PCT-Patienten, aktives Krankheitsstadium

Serum-Nr.	Plasmaporphyrin Konzentration ($\mu\text{g/dl}$)	Abnahme der hämolytischen Akti- vität (%) nach		
		5 J/cm^2	10 J/cm^2	50 J/cm^2
1	5,4	14,3	21,4	35,7
2	1,0	3,0	9,1	18,2
3	12,5	16,7	23,3	60,0
4	4,0	0	11,1	37,0
5	9,0	11,8	11,8	35,3
x	6,4	9,2	15,3	37,2
s	+/- 4,5	+/- 7,3	+/- 6,5	+/- 14,9

2. Unbehandelte PCT-Patienten in klinischer Remission

Serum-Nr.	Plasmaporphyrin Konzentration (ug/dl)	Abnahme der hämolytischen Akti- vität (%) nach		
		5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²
10	1,3	3,2	9,7	16,1
11	0,5	10,7	14,3	27,1
12	0,5	0	5,0	12,5
13	0,5	0	6,7	16,7
14	5,0	2,6	10,5	23,7
x	1,6	4,3	9,2	19,2
s	+/- 2,0	+/- 4,9	+/- 3,6	+/- 6,0

3. Behandelte PCT-Patienten

Serum-Nr.	Plasmaporphyrin Konzentration (ug/dl)	Abnahme der hämolytischen Akti- vität (%) nach		
		5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²
6	2,9	3,3	10,0	30,0
7	0,6	0	6,3	21,9
8	7,0	10,0	22,5	35,0
9	0,5	4,3	6,5	17,4
x	2,8	5,9	11,3	26,1
s	+/- 3,0	+/- 4,7	+/- 7,6	+/- 7,9

4. Normalkollektiv

Serum-Nr.	Plasmaporphyrin Konzentration (ug/dl)	Abnahme der hämolytischen Akti- vität (%) nach		
		5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²
1	-	0	0	18,8
2	-	0	5,7	11,4
3	-	0	2,5	7,6
4	-	0	0	10,0
5	-	0	6,3	12,5
6	-	0	5,1	10,3
x	-	0	3,3	11,8
s	-	0	+/- 2,8	+/- 3,8

In Abb. 14 ist die prozentuale Abnahme der hämolytischen Komplementaktivität in allen 4 Gruppen nach Bestrahlung mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA durch die Höhe der Säulen markiert.

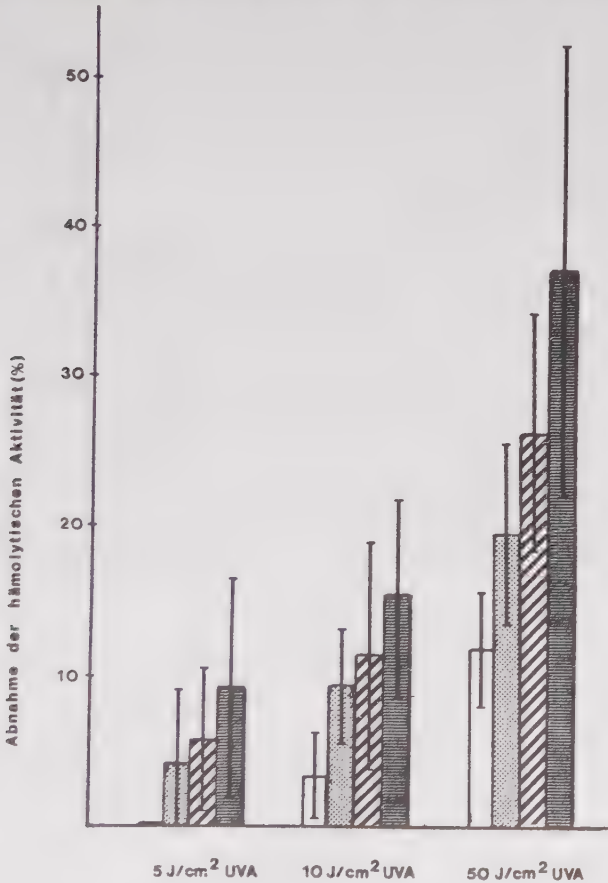


Abb. 14: Mittlerer Abfall von CH50 (%) in Normalserum (□) und in den Seren

- 1.) der unbehandelten PCT-Patienten in klinischer Remission (▨),
- 2.) der behandelten PCT-Patienten (▩) sowie
- 3.) der unbehandelten PCT-Patienten im aktiven Krankheitsstadium (■).

Korrelation zwischen UVA-induzierten CH50-Abfall und der Plasmaporphyrinkonzentration in den Patientenseren:

Aus Tab. 5 sind die Konzentrationen der Plasmaporphyrine in den verschiedenen Patientengruppen ersichtlich. Die unbehandelten PCT-Patienten im aktiven Krankheitsstadium wiesen mit 6,4 ug/dl Serum den höchsten, die behandelten Patienten mit 2,8 ug/dl Serum einen wesentlichen geringeren und die in Remission befindlichen Patienten mit 1,6 ug/dl den niedrigsten Plasmaporphyrinspiegel auf. Es fiel auf, daß in der Patientengruppe mit der höchsten Plasmaporphyrinkonzentration auch der größte CH50-Abfall gemessen wurde. Es wurde daher, wie Abb. 15 zeigt, der Abfall der Serumkomplementaktivität aller PCT-Patienten nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA gegen die jeweilige Konzentration der Gesamtporphyrine im Serum dieser Patienten aufgetragen.

Es zeigt sich eine nahezu lineare Korrelation zwischen UVA-induziertem Abfall von CH50 und Porphyrinkonzentrationen ($r=0,89$). Im Serum mit der höchsten Porphyrinkonzentration mit mehr als 10 ug/dl kam es zu einem UVA-induzierten Aktivitätsverlust von 60 %. In den 6 Patientenseren mit Porphyrinkonzentrationen im Normbereich ($\leq 1,1$ ug/dl) lagen die Komplementveränderungen meist noch im Fehlerbereich der Methode.

4.2. Auftreten von C3c-Spaltprodukten in PCT-Seren nach UVA-Bestrahlung

Der Nachweis von C3c-Spaltprodukten erfolgte in sämtlichen PCT-Patientenseren mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese nach Laurell (CIEP = crossed immunoelectrophoresis). Das Ausmaß der C3-Spaltung (%) wurde planimetrisch mit der in Kap. 3.1.3. beschriebenen Methode berechnet.

Abb. 16 a-d zeigt die zunehmende C3-Spaltung im Serum eines unbehandelten Patienten mit aktiver PCT (Nr. 1) nach UVA-Bestrahlung in steigender Dosis (1-50 J/cm²).

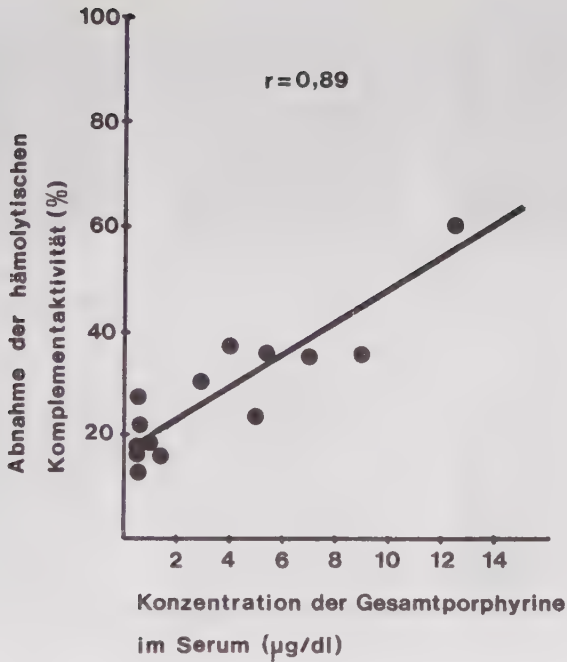


Abb. 15: Korrelation zwischen dem phototoxisch induzierten CH50-Abfall (%) nach Bestrahlung der Patientenserum mit 50 J/cm^2 UVA und der Konzentration der Gesamtporphyrine im Serum ($\mu\text{g/dl}$) dieser Patienten.

Als Kontrolle diente das, während der Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA, lichtgeschützte Serum des gleichen Patienten (siehe Abb. 16 e). In Normalserum war, wie Abb. 16 f zeigt, die C3-Konversion auch nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA kaum wahrnehmbar und noch geringer ausgeprägt als im Patientenserum nach 1 J/cm^2 UVA.

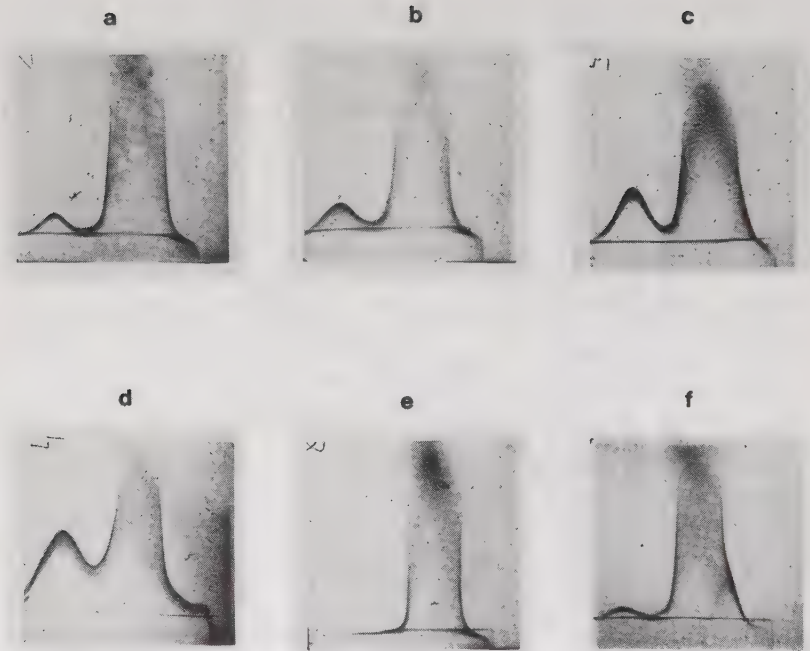


Abb. 16: Zweidimensionale Immunelektrophorese:
 Zunahme der C3-Spaltung im Serum eines Patienten
 mit PCT nach UVA-Bestrahlung.
 Der kathodenwärts gelegene Gipfel repräsentiert
 das ungespaltene C3 und der anodenwärts gelegene
 Gipfel das C3c-Spaltprodukt.
 a-d = Mit steigenden UVA-Dosen (1, 5, 10 und 50
 J/cm^2) bestrahltes PCT-Serum
 e = Während der Bestrahlung mit $50 \text{ J}/\text{cm}^2$ UVA
 lichtgeschütztes PCT-Serum (Kontrolle 2)
 f = Mit $50 \text{ J}/\text{cm}^2$ UVA bestrahltes Normalserum

In Tab. 6 ist die C3-Spaltung in den 14 Patientenseren und 6 Normalseren nach Bestrahlung mit 1, 5, 10 und $50 \text{ J}/\text{cm}^2$ UVA einschließlich der Kontrollen zusammengestellt.

Man sieht:

- a) In 6 von 14, während der Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA lichtgeschützten Patientenserum (Kontrolle 2) kam es gegenüber den unbestrahlten Kontrollen (Kontrolle 1) zu einer geringgradigen C3-Spaltung von 0,3-5,1 %. Diese unspezifische C3-Spaltung ist bereits in der Tabelle von den Meßwerten nach Bestrahlung mit 1, 5, 10 und 50 J/cm^2 UVA abgezogen.
- b) In 5 der 14 Patientenserum konnte man bereits nach Bestrahlung mit 1 J/cm^2 UVA Hinweise für eine geringgradige C3-Spaltung finden (vgl. auch Abb. 21).
- c) In 10 von 14 Patientenserum trat nach Bestrahlung mit 5 J/cm^2 UVA gegenüber den Kontrollen eine planimetrisch gemessene C3-Spaltung von 0,2 bis 11,4 % ein. Nach Bestrahlung mit 10 J/cm^2 UVA konnte in allen Patientenserum eine C3-Spaltung gemessen werden (1,1 bis 16,2 %). Dagegen war in keinem der 6 Normalserum nach Bestrahlung mit den gleichen UVA-Dosen eine C3-Spaltung sichtbar.
- d) Nach 50 J/cm^2 UVA betrug die C3-Spaltung im Patientenskollektiv durchschnittlich 16 %. Dagegen überstieg die C3-Spaltung in den Normalserum nie 8 %.

Tab. 7 und Abb. 17 zeigen, daß die C3-Spaltung ebenso wie die Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität in der Gruppe der unbehandelten Patienten mit dem höchsten Plasmaporphyrinspiegel am ausgeprägtesten war (23 %). Zwischen den Seren der in Remission befindlichen und den Seren der behandelten Patientengruppe zeigte sich nach 10 und 50 J/cm^2 UVA kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der C3-Spaltung. In den Seren der Normalpersonen fand sich in allen Bestrahlungsdosen deutlich die geringste C3-Spaltung.

Tab. 6: C3-Spaltung in den 14 Seren der Patienten mit PCT und in den 6 Normalseren nach Bestrahlung mit 1, 5, 10 und 50 J/cm² UVA. Die unspezifische C3-Spaltung der Kontrollen ist von den Meßwerten nach Bestrahlung bereits abgezogen.

Kontrolle 1: unbestrahltes Serum

Kontrolle 2: während der Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA vor Licht geschütztes Serum

PCT-Patienten

Serum-Nr.	C3-Spaltung (%) nach				Kontr. Kontr.	
	1 J/cm ²	5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²	1	2
1	4,7	11,4	16,2	26,5	0	0
2	0	1,2	3,5	10,0	0	0
3	0	5,1	13,8	32,5	0	0
4	0	0	11,9	20,0	0	0
5	1,0	6,2	8,9	25,6	5,1	7,6
6	1,2	6,8	9,9	15,9	1,4	1,3
7	0	0,2	1,1	9,1	0	5,1
8	0	2,6	7,4	10,5	0	0
9	0,6	3,9	6,1	12,0	4,9	5,3
10	0	0	7,5	8,7	0	0
11	0,7	1,6	6,3	16,0	8,1	8,4
12	0	0	2,1	4,7	0	0
13	0	0	7,6	11,5	2,3	5,3
14	0	2,8	5,2	15,7	0	0

Normalkollektiv

Serum-Nr.	C3-Spaltung (%) nach				Kontr. Kontr.	
	1 J/cm ²	5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²	1	2
1	0	0	0	6,7	0	0
2	0	0	0	3,8	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	5,9	0	0
5	0	0	0	4,1	0	0
6	0	0	0	7,9	0	0

Tab. 7: C3-Spaltung (%) und Plasmaporphyrinkonzentrationen (ug/dl) in den Patientengruppen und im Normalkollektiv nach Bestrahlung der Seren mit 1, 5, 10 und 50 J/cm² UVA.

x = Mittelwert

s = Standardabweichung

1. unbehandelte PCT-Patienten, aktives Stadium					
Serum Nr.	Plasmaporphyrinkonz. (ug/dl)	C3-Spaltung (%) nach Abzug von K 2			
		1 J/cm ²	5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²
1	5,4	4,7	11,4	16,2	26,5
2	1,0	0	1,2	3,5	10,0
3	12,5	0	5,1	13,8	32,5
4	4,0	0	0	11,9	20,0
5	9,0	1,0	6,2	8,9	25,6
x	6,4	1,1	4,8	10,9	22,9
s	+/- 4,5	+/- 2,0	+/- 4,5	+/- 4,9	+/- 8,5
2. unbehandelte Patienten in klinischer Remission					
Serum Nr.	Plasmaporphyrinkonz. (ug/dl)	C3-Spaltung (%) nach Abzug von K 2			
		1 J/cm ²	5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²
10	1,3	0	0	7,5	8,7
11	0,5	0,7	1,6	6,3	16,0
12	0,5	0	0	2,1	4,7
13	0,5	0	0	7,6	11,5
14	5,0	0	2,8	5,2	15,7
x	1,6	0,1	0,9	5,7	11,3
s	+/- 2,0	+/- 0,3	+/- 1,3	+/- 2,3	+/- 4,8
3. Behandelte PCT-Patienten					
Serum Nr.	Plasmaporphyrinkonz. (ug/dl)	C3-Spaltung (%) nach Abzug von K 2			
		1 J/cm ²	5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²
6	2,9	1,2	6,8	9,9	15,9
7	0,6	0	0,2	1,1	9,1
8	7,0	0	2,6	7,4	10,5
9	0,5	0,6	3,9	6,1	12,0
x	2,8	0,5	3,4	6,1	11,9
s	+/- 3,0	+/- 0,6	+/- 2,8	+/- 3,7	+/- 2,9

4. Normalkollektiv

Serum Nr.	Plasmaporphyrin- konz. (ug/dl)	C3-Spaltung (%) nach Abzug von K 2			
		1 J/cm ²	5 J/cm ²	10 J/cm ²	50 J/cm ²
1	-	0	0	0	6,7
2	-	0	0	0	3,8
3	-	0	0	0	0
4	-	0	0	0	5,9
5	-	0	0	0	4,1
6	-	0	0	0	7,9
x	-	0	0	0	4,7
s	-	+/- 0	+/- 0	+/- 0	+/- 2,8

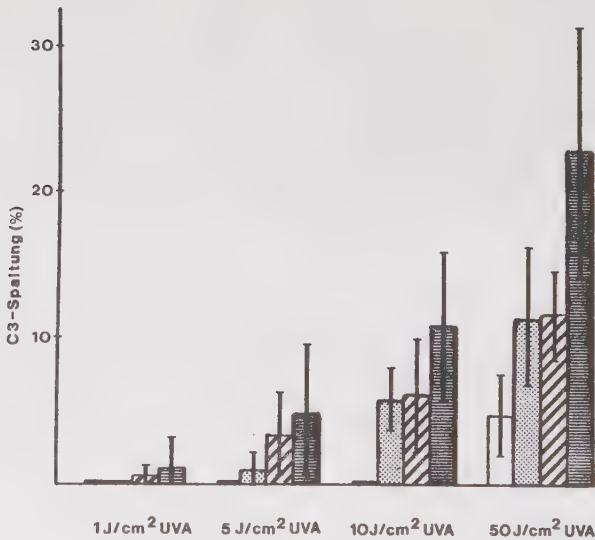


Abb. 17: Mittlere Zunahme der C3-Spaltung (%) in Normalseren (□) und in den Seren 1.) der unbehandelten PCT-Patienten in klinischer Remission (▤), 2.) der behandelten PCT-Patienten (▨) sowie 3.) der unbehandelten PCT-Patienten, aktives Stadium (▧).

Abb. 18 zeigt, daß die C3-Spaltung, ebenso wie der UVA-induzierte CH50-Abfall, in den PCT-Patientenseren nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA eine hohe Korrelation ($r=0,81$) zum Plasmaporphyrinspiegel aufwies.

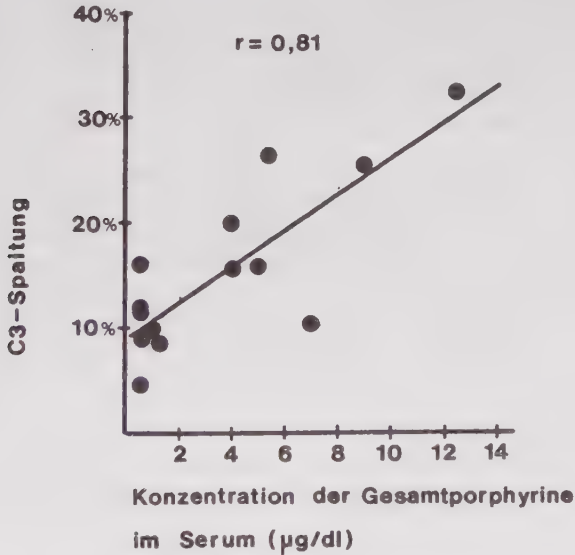


Abb. 18: Korrelation zwischen der phototoxisch induzierten C3-Spaltung (%) in den Patientenseren nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA und der Konzentration der Gesamtporphyrine im Serum ($\mu\text{g/dl}$) dieser Patienten.

4.3. Vergleich der Methoden zur Bestimmung von Komplementveränderungen

Zum Vergleich beider Meßmethoden wurden sämtliche Meßwerte in den oben aufgeführten Versuchen herangezogen.

In Abb. 19 sind beide Meßgrößen - also der funktionell gemessene Abfall der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität

(%) und die planimetrisch berechnete, prozentuale C3-Spaltung gegeneinander aufgetragen. Man sieht, daß zwischen diesen Meßgrößen eine sehr gute Korrelation bestand ($r=0,94$).

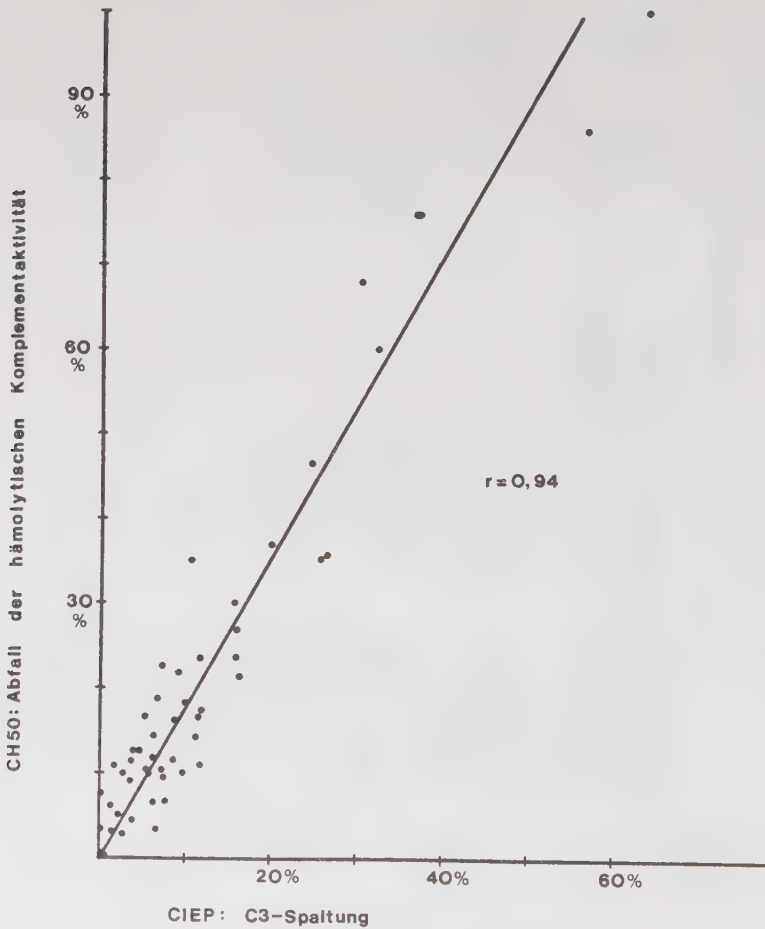


Abb. 19: Korrelation zwischen dem Abfall der hämolytischen Komplementaktivität und der C3-Spaltung in den Serumproben.

4.4. Veränderungen der Proteinkonzentrationen der Komplementkomponenten C3 und C4 nach phototoxischer Komplementaktivierung

In einem PCT-Patientenserum und in verschiedenen mit Uroporphyrin vorbehandelten Normalseren, die alle mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt worden waren, wurden die Proteinkonzentrationen der Komplementkomponenten C3 und C4 mittels der radialen Immundiffusion nach Mancini ermittelt. Es sollte untersucht werden, ob die phototoxische Komplementaktivierung mit dieser wesentlich einfacheren Methode erfaßt werden kann.

Die Ergebnisse (siehe Tab. 8) zeigen, daß mit dieser Methode keine signifikanten Veränderungen im Serumspiegel beider Komplementkomponenten gemessen werden konnten. Der Bereich der gemessenen Konzentrationen lag durchaus noch im Fehlerbereich der Meßmethode von $\pm 15 \%$. Dies ist von besonderem Interesse, da die Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA in einem Serum mit $10 \text{ ug Uroporphyrin/ml}$ zu einem vollständigen Verlust der hämolytischen Komplementaktivität bzw. zu einer über 60%igen Spaltung des C3-Moleküls geführt hatte. Die radiale Immundiffusion nach Mancini konnte also keine Aussage über den Aktivitätszustand der Komplementkomponenten C3 und C4 machen.

Tab. 8: Proteinkonzentration von C3 und C4 im Serum eines Patienten mit aktiver PCT nach Bestrahlung mit 1, 5, 10 und 50 J/cm^2 UVA und im Normalserum nach Zusatz von Uroporphyrin ($0,3\text{-}10 \text{ ug/ml}$ Serum) nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA

NHS = Normalserum

Normalwerte: C3 = $50\text{-}120 \text{ mg/dl}$

C4 = $20\text{-}50 \text{ mg/dl}$

	C3 (mg/dl)	C4 (mg/dl)
PCT-Serum (Nr. 3) unbestrahlt	81	44
PCT-Serum (Nr. 3) + 1 J/cm^2 UVA	77	36
PCT-Serum (Nr. 3) + 5 J/cm^2 UVA	77	36
PCT-Serum (Nr. 3) + 10 J/cm^2 UVA	94	44,2
PCT-Serum (Nr. 3) + 50 J/cm^2 UVA	70	38

	C3 (mg/dl)	C4 (mg/dl)
NHS ohne UP + 50 J/cm ² UVA	82	45,4
NHS + 0,3 ug UP/ml	77	42
NHS + 0,6 ug UP/ml	73	42
NHS + 1,2 ug UP/ml	73	45,4
NHS + 2,5 ug UP/ml	82	42
NHS + 5,0 ug UP/ml	73	45,4
NHS + 10 ug UP/ml	82	48,8

4.5. Phototoxische Komplementaktivierung in Normalserum nach Zusatz von photoaktiven Substanzen

4.5.1. Zusatz von Uroporphyrin

In dieser Versuchsreihe wurden steigende Konzentrationen von Uroporphyrin zu Normalserum gegeben und Endkonzentrationen von 0,3 bis 10 ug Uroporphyrin/ml Serum hergestellt. Die uroporphyrinhaltigen Seren wurden in gleicher Weise wie die Patientenserum mit UVA-Licht bestrahlt und das Ausmaß der Komplementaktivierung ermittelt.

Tab. 9 und Abb. 20 zeigen, daß die UVA-Einwirkung von 10 J/cm² UVA auf Normalserum mit 0,3 ug Uroporphyrin/ml bereits zu einer deutlichen Abnahme der Gesamtkomplementaktivität führte, die dosisabhängig zunahm. Noch ausgeprägter war der Abfall von CH50 nach Einwirkung von 50 J/cm² UVA, wo bereits 0,3 ug Uroporphyrin/ml Serum eine ca. 50%ige Abnahme des Gesamtkomplements induzieren konnten. Im Vergleich dazu konnte in Normalserum, dem allein Puffer zugesetzt wurde, nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA nur eine geringe Abnahme der Komplementaktivität von 13,3 % beobachtet werden, die wahrscheinlich methodisch bedingt war.

Der phototoxische Effekt von Uroporphyrin auf das Komplementsystem in Normalserum konnte auch durch die zweidimensionale Immunelektrophorese sichtbar gemacht werden.

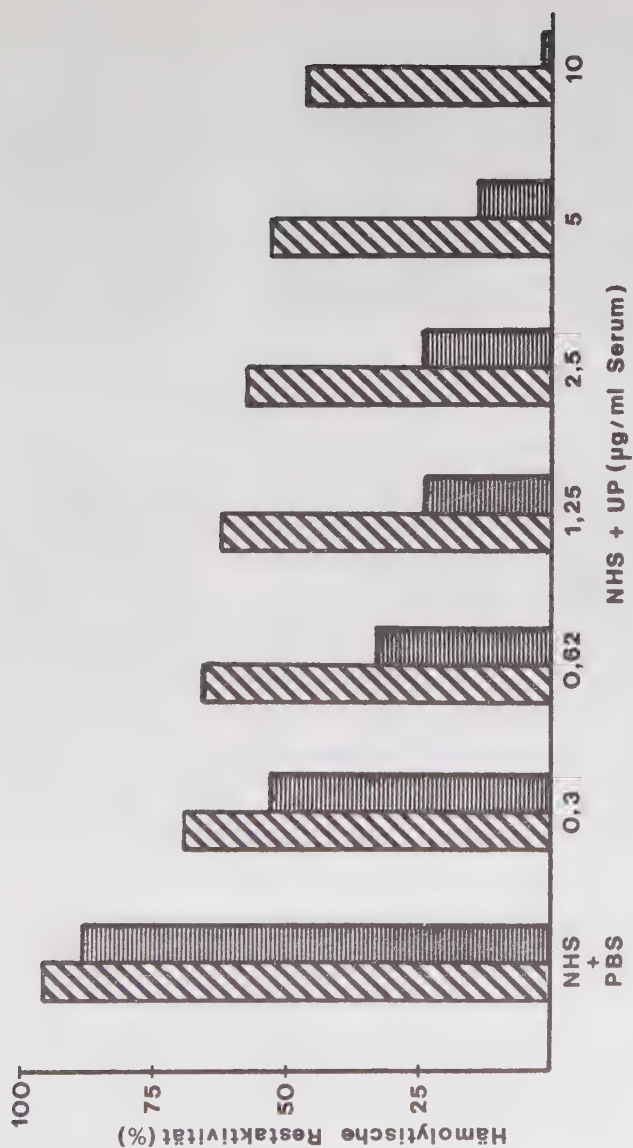


Abb. 20: Abnahme der hämolytischen Aktivität in uroporphyrinhaltigen Normalseren (0,3 - 10 µg/ml Serum) nach Bestrahlung mit 10 J/cm² UVA (▨) und 50 J/cm² UVA (■). Als Kontrollen dienten phosphatgepufferte Normalseren ohne Uroporphyrinzusatz.

Tab. 9: Abnahme der hämolytischen Aktivität und Zunahme der C3-Spaltung in uroporphyrinhaltigen Seren (0,3-10 ug/ml) nach UVA-Bestrahlung mit 10 und 50 J/cm².

NHS* = Normalserum, das während der UVA-Bestrahlung lichtgeschützt war.

NHS + PBS = bestrahltes Normalserum, das statt Uroporphyrin Phosphatpuffer enthielt.

	NHS*	NHS+PBS	NHS + Uroporphyrin (ug/ml NHS)					
			0,3	0,62	1,25	2,5	5	10
CH50 nach 10 J/cm ² UVA	175	165	120	115	110	100	92	80
Abnahme (%)	0	5,7	31,4	34,4	37,1	42,9	47,4	54,3
CH50 nach 10 J/cm ² UVA	150	130	80	48	36	36	21	0
Abnahme (%)	0	13,3	46,7	68,0	76,0	76,0	86,0	100
C3-Spaltung(%) nach 50 J/cm ²	0	3,8	24,6	30,2	37,0	37,0	57,0	63,7

Abb. 21 zeigt einige Beispiele. Man sieht die mit steigender Uroporphyrindosis zunehmende Spaltung des C3-Proteins nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA. In Abb. 22 ist die planimetrisch berechnete C3-Spaltung in diesen uroporphyrinhaltigen Seren durch die Höhe der Säulen markiert.

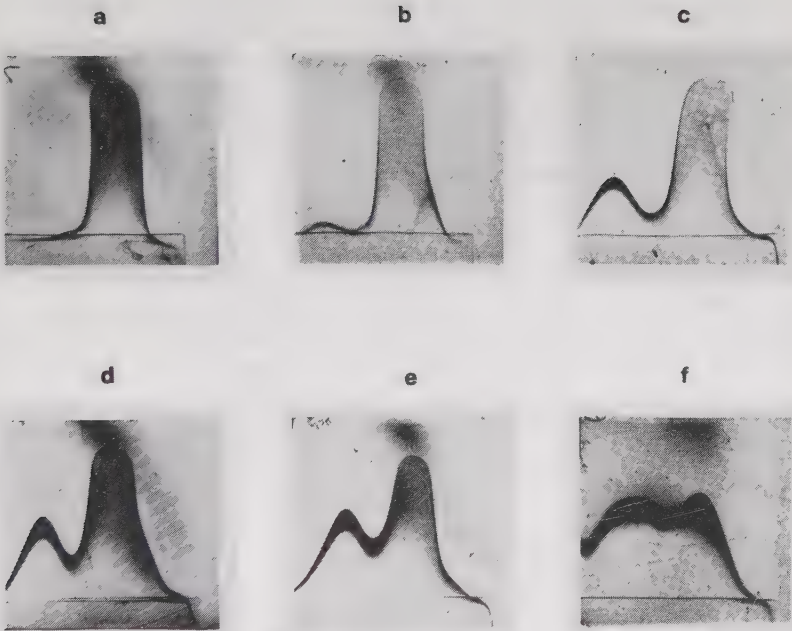


Abb. 21: Zweidimensionale Immunelektrophorese:
Zunahme der C3-Spaltung in Normalserum nach Zusatz
von steigenden Uroporphyrinkonzentrationen und
UVA-Bestrahlung mit 50 J/cm^2 .

Der kathodenwärts gelegene Gipfel repräsentiert das ungespaltene C3 und der anodenwärts gelegene Gipfel das C3c-Spaltprodukt.

a = Während der Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA lichtgeschütztes Normalserum

b = Mit 50 J/cm^2 UVA bestrahltes Normalserum

c-f = Mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlte Seren nach Zusatz von steigenden Uroporphyrinkonzentrationen (0,3; 0,6; 2,5 und 10 ug/ml)

4.5.2. Zusatz von vorbestrahlten Uroporphyrin

In dieser Versuchsreihe wurde eine Uroporphyrinlösung mit 100 J/cm^2 UVA vorbestrahlt und mit Normalserum zu einer Konzentration von $10 \text{ ug Uroporphyrin/ml Serum}$ verdünnt. Eine Uroporphyrinlösung gleicher Konzentration wurde mit unbestrahlten Uroporphyrin hergestellt. Beide Proben wurden anschließend mit UVA-Licht bestrahlt und das Ausmaß der Komplementaktivierung bestimmt.

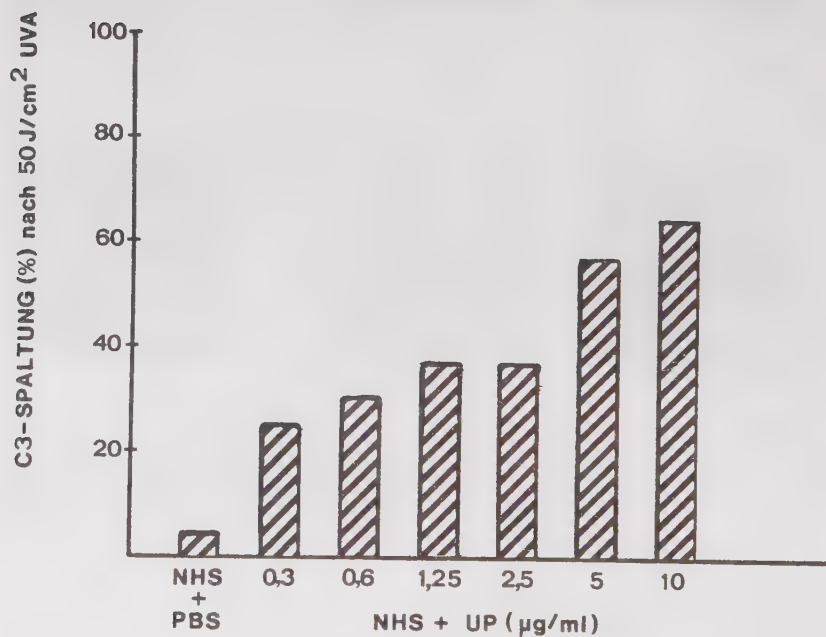


Abb. 22: Zunahme der C3-Spaltung in uroporphyrinhaltigen Normalseren ($0,3 - 10 \text{ ug/ml Serum}$) nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA. Als Kontrolle diente phosphatgepuffertes Normalserum ohne Zusatz von Uroporphyrin (NHS + PBS).

Tab. 10 zeigt, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen das Uroporphyrin auch nach Vorbestrahlung noch phototoxisch

aktiv war, allerdings geringer als unbestrahltes Uroporphyrin. Dieser Unterschied konnte vor allem durch die zweidimensionale Immunelektrophorese deutlich gemacht werden.

Das Ausmaß der UVA-induzierten C3-Spaltung war im Serum, das 10 ug vorbestrahltes Uroporphyrin/ml enthielt nur halb so groß wie in der Probe mit unbestrahlten Uroporphyrin und entsprach etwa der C3-Spaltung, die mit 0,6 ug unbestrahlten Uroporphyrin/ml Serum beobachtet wurde (vgl. Tab. 9).

Tab. 10: Hämolytische Aktivität (CH50) und C3-Spaltung in Normalserum nach Zusatz von unbestrahlten und vorbestrahlten Uroporphyrin (10 ug/ml Serum) nach UVA-Bestrahlung (50 J/cm²).

1. Während der Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA lichtgeschütztes Normalserum (NHS*),
2. mit 50 J/cm² bestrahltes, phosphatgepuffertes Normalserum ohne Uroporphyrinzusatz (NHS + PBS).

	NHS*	NHS+PBS	NHS+10 ug vorbestrahl- tes UP	NHS+10 ug unbestrahl- tes UP
CH50 nach 50 J/cm ² UVA	150	135	38	0
Abnahme (%)	0	10,0	74,7	100
C3-Spaltung (%)	0	5,6	30,6	65,0

4.5.3. Einfluß von Chelatbildnern (EGTA/Mg²⁺ und EDTA) auf die phototoxische Komplementaktivierung

In dieser Versuchsreihe wurden uroporphyrinhaltige Seren mit den Chelatbildnern EGTA (10 mmol) Mg²⁺ (5 mmol) zur selektiven Blockade des klassischen Aktivierungsweg bzw. mit EDTA (30 mmol) zur Blockade sowohl des klassischen als auch des alternativen Pathways versetzt. Nach Bestrahlung mit UVA-Licht wurde das Ausmaß der phototoxischen Komplementaktivierung bestimmt.

Tab. 11 und Abb. 23 zeigen, daß die phototoxische C3-Spaltung durch EGTA/Mg²⁺ nicht gehemmt wurde, während die EDTA-Vorbehandlung des Serums zu einer Reduzierung der phototoxischen C3-Spaltung um etwa 50 % führte.

Tab. 11: C3-Spaltung (%) in uroporphyrinhaltigen Normalserum (1,25 und 10 ug/ml) nach Zusatz von EGTA (10 mmol)/Mg²⁺ (5 mmol) und EDTA (30 mmol) und nachfolgender Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA. Als Kontrollen dienten

- phosphatgepuffertes Normalserum (NHS + PBS) nach Zusatz von EGTA/Mg²⁺ und EDTA bzw. ohne Zusätze.
- Uroporphyrinhaltiges Normalserum, das während der Bestrahlung lichtgeschützt war (NHS* + 10 ug UP/ml).

	C3-Spaltung (%) nach 50 J/cm ² UVA		
	mit EGTA/Mg ²⁺	mit EDTA	ohne Zusatz
NHS + 1,25 ug UP/ml	30,9	17,3	31,3
NHS + 10 ug UP/ml	73,7	31,5	72,1
NHS + PBS	7,9	4,1	5,2
NHS* + 10 ug UP/ml			0

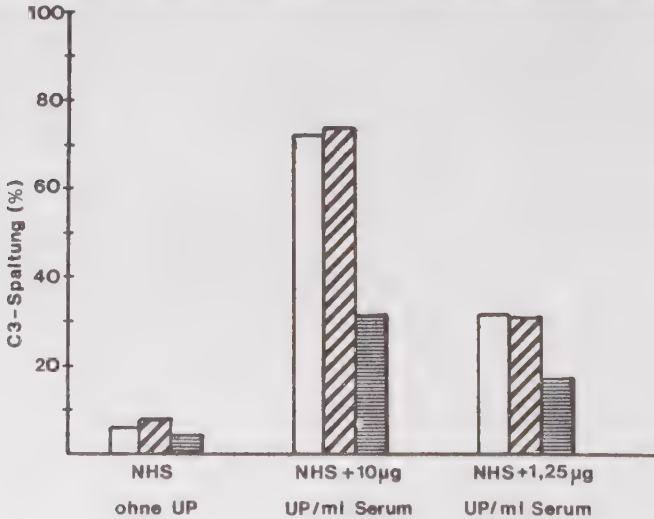


Abb. 23: C3-Spaltung in uroporphyrinhaltigen Normalserum ohne weitere Zusätze (□) und nach Zusatz von EGTA/Mg²⁺ (▨) bzw. EDTA (■). Als Kontrolle diente Normalserum ohne Uroporphyrin.

4.6. Effekt therapeutisch wirksamer Substanzen auf die phototoxische Komplementaktivierung

4.6.1. Beta-Carotin

In dieser Versuchsreihe wurde entweder Uroporphyrin allein (1,2 ug/ml Serum) oder zusammen mit beta-Carotin in der 2-4fachen therapeutischen Dosis (10 bzw. 20 ug/ml Serum) zu Normalserum gegeben. Alle Serumproben wurden mit 50 J/cm² UVA bestrahlt. Das Ausmaß der C3-Spaltung wurde mittels CIEP ermittelt. In den Kontrollen wurde Normalserum nur mit PBS-Puffer versetzt oder während der Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA vor Licht geschützt.

Tab. 12 zeigt, daß beta-Carotin in der 2-4fachen therapeutischen Dosis in vitro keinen Einfluß auf die phototoxische Komplementaktivierung durch Uroporphyrin hat.

Tab. 12: C3-Spaltung in uroporphyrinhaltigen Normalserum (1,2 ug/ml) mit und ohne Zusatz von beta-Carotin nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA. Als Kontrollen dienten lichtgeschütztes Normalserum mit Uroporphyrin (NHS* + 1,2 ug UP/ml) und bestrahltes, phosphatgepuffertes Normalserum (NHS + PBS) mit und ohne beta-Carotinzusatz.

	C3-Spaltung (%) nach 50 J/cm ² UVA		
	+ 10 ug Carotin/ml	+ 20 ug Carotin/ml	ohne Carotin
NHS+1,2 ug UP/ml	34,0	32,3	32,5
NHS+PBS		4,2	4,6
NHS* +1,2 ug UP/ml			0

4.6.2. Chloroquin

In dieser Versuchsreihe wurde entweder Uroporphyrin allein (0,6 und 2,5 ug/ml Serum) oder zusammen mit einer therapeu-

tisch wirksamen Dosis von Chloroquin (500 ug/ml Serum) zu Normalserum gegeben. In einem weiteren Versuchansatz wurde 1,25 ug Uroporphyrin/ml einem Serum zugesetzt, das von einem Patienten stammte, der wegen eines diskoiden Lupus erythematoses unter einer mehrwöchigen Therapie in einer Dosierung von 500 mg Chloroquin/Tag stand.

Alle Serumproben wurden mit 50 J/cm^2 UVA bestrahlt. Das Ausmaß der C3-Spaltung wurde mittels CIEP ermittelt. In den Kontrollen wurde uroporphyrinhaltiges Normalserum während der Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA vor Licht geschützt oder mit Phosphatpuffer mit und ohne Chloroquinzusatz versetzt.

Tab. 13 zeigt, daß die Zugabe einer therapeutisch wirksamen Dosis Chloroquin auf die phototoxischen Komplementaktivierung durch Uroporphyrin keinen Einfluß hat. Mit beiden Uroporphyrinkonzentrationen entstand im Serum eine annähernd gleichgroße C3-Spaltung, die vom Chloroquinzusatz unabhängig war. Auch im Serum des Lupus erythematosus-Patienten zeigte sich kein Einfluß von Chloroquin auf die phototoxische Komplementaktivierung durch Uroporphyrin.

Tab. 13: C3-Spaltung in uroporphyrinhaltigen Normalseren (0,6 und 2,5 ug UP/ml Serum) mit und ohne Zusatz von Chloroquin (500 ug/ml Serum) nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA.

NHS* + 2,5 ug UP/ml = lichtgeschütztes Normalserum
mit 2,5 ug Uroporphyrin/ml
NHS + PBS = phosphatgepuffertes, bestrahltes Normalserum

	C3-Spaltung (%) nach 50 J/cm^2 UVA	
	mit Chloroquin	ohne Chloroquin
NHS+0,6 ug UP/ml	29,5	29,8
NHS+2,5 ug UP/ml	50,0	50,6
NHS+PBS	5,9	6,4
NHS*+2,5 ug UP/ml	2,0	1,4

5. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Uroporphyrin und langwelligen UV-Licht auf das Komplementsystem *in vitro* untersucht. Die Untersuchung erfolgte in Seren von 14 Patienten mit Porphyria cutanea tarda sowie in Seren von Normalpersonen nach Zusatz von Uroporphyrin unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Die Patienten wurden in drei Gruppen eingeteilt:

1. unbehandelte Patienten, aktives Krankheitsstadium,
2. unbehandelte Patienten in klinischer Remission,
3. behandelte Patienten.

Die Serumproben wurden mit einer UVA-Hochleistungslichtquelle (UVA SUN 5000) bestrahlt (83), die ausschließlich Energie im Wellenlängenbereich von 320-460 nm mit einem Maximum zwischen 360-390 nm emittierte (siehe Abb. 5). Somit wurde die gesamte Absorptionsbande der Porphyrinmoleküle von 360-440 nm erfaßt (vgl. Abb. 2). Die Bestrahlungsdosen sollten in einem möglichst physiologischen Bereich liegen. Nach der Definition der "Commission Internationale de l'Eclairage" (CIE) beträgt bei wolkenlosen Himmel, senkrechten Sonnenstand und 4 1/2 stündiger Einstrahlung in Meereshöhe die von der Sonne abgegebene Energie ca. 100 J/cm^2 UVA. Beim weißen Hauttyp kann ca. 45 % der UVA-Strahlung die menschliche Epidermis durchdringen (28). Deshalb wurden für die Bestrahlung der Seren *in vitro* UVA-Dosen von 1, 5, 10 und 50 J/cm^2 gewählt.

Die phototoxisch-induzierten Komplementveränderungen wurden in den PCT-Seren nach UVA-Bestrahlung anhand von zwei Parametern verfolgt:

1. Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität im Serum (CH50), funktionell bestimmt nach der Methode von Rapp und Borsos (93).
2. Auftreten von C3c-Spaltprodukten, nachgewiesen mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese (CIEP) mit der Modifikation nach Laurell (58).

Die Ergebnisse zeigten, daß die in-vitro-Bestrahlung der Patientenserum mit 5, 10 und 50 J/cm² UVA zu einer deutlichen Abnahme von CH50 führte, die in den Seren proportional zur Bestrahlungsdosis zunahm. Nach Bestrahlung mit der gewählten Höchstdosis von 50 J/cm² UVA fiel die hämolytische Gesamtkomplementaktivität im Durchschnitt um ca. 28 % ab, während in den Seren der Normalpersonen unter gleichen Versuchsbedingungen nur ein mittlerer Abfall der hämolytischen Aktivität von 12 % auftrat. Dieser Abfall in den UVA-bestrahlten Normalseren ist vermutlich auf thermische Einwirkungen während des Bestrahlungsvorgangs zurückzuführen.

Aus Tab. 5 und Abb. 14 ist zu ersehen, daß sich das Ausmaß des phototoxisch-induzierten Komplementverbrauchs in den einzelnen Patientengruppen deutlich unterschied. Der Komplementabfall war in allen gewählten Bestrahlungsdosen bei den unbehandelten Patienten im aktiven Krankheitsstadium, welche die höchsten Plasmaporphyrinspiegel aufwiesen, am stärksten ausgeprägt. Dagegen zeigten die in Remission befindlichen Patienten, die nur leicht erhöhte Plasmaporphyrinkonzentrationen aufwiesen, die geringste Abnahme der Gesamtkomplementaktivität. Diese lag aber noch signifikant über dem Normalkollektiv. Die Patienten, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits unter einer Resochintherapie standen, aber klinisch noch Krankheitsaktivität zeigten, lagen sowohl hinsichtlich der Porphyrinwerte als auch der UVA-induzierten Komplementaktivierung zwischen den oben genannten Patientengruppen.

Abb. 15 zeigt, daß eine nahezu lineare Korrelation zwischen dem UVA-induziertem Abfall von CH50 und der Plasmaporphyrinkonzentration in den Patientenserum bestand. Das Ausmaß des Komplementsverbrauchs war also sowohl von der Bestrahlungsdosis als auch von der Plasmaporphyrinkonzentration abhängig.

Die vorliegende Arbeit zeigte weiterhin, daß der funktionell bestimmte Abfall der hämolytischen Komplementaktivität in allen bestrahlten Serumproben sehr gut mit der immunoelektrophoretisch gemessenen C3-Spaltung korrelierte, wie Abb. 19 verdeutlicht. Diese hohe Korrelation weist daraufhin, daß die Abnahme der Gesamtkomplementaktivität (CH50) in den Patientenserum zumindest zum Teil durch eine sequentielle Aktivierung des Komplementsystems mit Freisetzen von C3-

Spaltprodukten bedingt ist. Abb. 17 und 18 zeigen, daß die C3-Spaltung ebenso wie der CH50-Abfall in allen Patientengruppen mit steigender Bestrahlungsdosis und mit steigender Plasmaporphyrinkonzentration zunahm. Nach Bestrahlung mit der gewählten Höchstdosis von 50 J/cm^2 UVA kam es in den Patientenserum zu einer durchschnittlichen C3-Spaltung von 16 %, während in den Normalserum unter den gleichen Versuchsbedingungen nur eine geringe C3-Spaltung von ca. 5 % auftrat. Aus Tab. 7 und Abb. 17 ist außerdem ersichtlich, daß die C3-Spaltung in den Serum der unbehandelten Patienten im klinisch aktiven Krankheitsstadium am stärksten ausgeprägt war.

Der immunchemische Nachweis von C3c ist ein indirekter Hinweis auf die enzymatische Spaltung von C3 mit Freisetzung von biologisch wirksamen Entzündungsmediatoren insbesondere von C3a und C3b, die von großer pathophysiologischer Bedeutung sind. C3a ist ein hormonähnliches Peptid, daß permeabilitätssteigernd wirkt, glatte Muskulatur kontrahiert und Histamin aus Mastzellen und Basophilen freisetzen kann (13, 61, 80, 115). Das C3b-Fragment kann sich über spezifische Rezeptoren an Zellmembranen binden und dadurch eine Vielzahl zellulärer Funktionen steuern, wie zum Beispiel die Phagozytose von Fremdpartikeln und die Freisetzung von lysosomalen Enzymen aus Makrophagen und aus neutrophilen Granulozyten (38). Durch die Spaltung von C3 wird zusätzlich die Bildung des C5-spaltenden Enzyms C4b2a3b (C5-Konvertase) ermöglicht (91). Bei der Spaltung von C5 entsteht ein weiteres hormonähnliches Fragment (C5a), das wie C3a anaphylaktisch und zusätzlich chemotaktisch wirkt. Lim et al (65-67) konnten zeigen, daß nach UVA-Bestrahlung von PCT-Serum in vitro chemotaktische Aktivität freigesetzt wurde, die sich durch Zugabe von C5-Antiserum hemmen ließ. Die Autoren vermuteten daher, daß die Zunahme der chemotaktischen Aktivität in UVA-bestrahlten PCT-Serum eine Folge der Aktivierung und Spaltung von C5 ist.

In einer weiteren Versuchsreihe konnte die phototoxische Komplementaktivierung nach Zusatz von steigenden Uroporphyrinkonzentrationen zu Serum gesunder Personen und anschließender Bestrahlung mit UVA-Licht unter verschiedenen Bedingungen in vitro reproduziert werden. Auch hier waren, wie Abb. 20, 21 und 22 zeigen, die C3-Spaltung und der Abfall der hämolytischen Aktivität (CH50) umso ausgeprägter, je

größer die zugesetzte Porphyrinmenge oder verabreichte Bestrahlungsdosis war. Um etwa vergleichbare Komplementveränderungen wie in den Patientenserum auszulösen, mußten allerdings wesentlich höhere Konzentrationen von Uroporphyrin zu Normalserum gegeben werden. So nahm die hämolytische Komplementaktivität in dem Patientenserum mit dem höchsten Plasmaporphyrinspiegel von 12,5 ug/dl in demselben Ausmaß ab, wie unter gleichen Bestrahlungsbedingungen ein Normalserum nach Zusatz von 60 ug Uroporphyrin/dl. Daraus könnte man schließen, daß die endogen freigesetzten Porphyrine im Patientenserum mehrfach aktiver sind als das isolierte als Octometylester vorliegende und dem Serum zugegebene Uroporphyrin.

Es konnte gezeigt werden, wie Tab. 10 verdeutlicht, daß Uroporphyrin nach Vorbestrahlung mit 100 J/cm² UVA schwächer komplementaktivierend wirkt. Die Vorbestrahlung mit UVA-Licht führt wahrscheinlich zu einer Inaktivierung der Uroporphyrinmoleküle oder zum Entstehen von weniger aktiven Photoprodukten. Von Lim und Gigli (63) wurden ähnliche Versuche, allerdings mit Protoporphyrin, durchgeführt, das zu 55 % aus Hämatoporphyrin, zu 19 % aus Protoporphyrin und zu 26 % aus vier anderen Porphyrinen bestand. Diese Autoren beobachteten, daß die Komplementaktivierung von Porphyrinen durch Vorbestrahlung mit UVA aufgehoben wurde. Sie folgerten daraus, daß die Porphyrinmoleküle möglicherweise nur im kurzzeitigen, durch UVA-Licht angeregten Zustand mit dem Komplementsystem reagieren können.

Der Mechanismus der Komplementaktivierung durch Porphyrine ist derzeit noch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die UVA-induzierte Komplementaktivierung durch Uroporphyrin von Substanzen gehemmt werden kann, die auf unterschiedliche Weise die Komplementaktivierung blockieren. Es wurden die Chelatbildner EGTA (10 mmol)/Mg²⁺ (5 mmol) und EDTA (30 mmol) zu Normalserum gegeben, das Uroporphyrin in hoher Konzentration enthielt (10 ug/ml). EGTA/Mg²⁺ bindet die für die Bildung eines stabilen C1qrs-Komplexes benötigten Ca²⁺-Ionen (116) und blockiert damit den klassischen Komplementaktivierungsweg (32). EDTA verhindert zusätzlich die Aktivierung des alternativen Wegs, indem es nicht nur mit den Ca²⁺-Ionen, sondern auch mit den für die Funktion der C3-Konvertase wichtigen Mg²⁺-Ionen Chelate bildet (35, 86). Abb. 23 zeigt, daß EGTA/Mg²⁺ in einer

Konzentration, die nach Angaben der Literatur (32) für die vollständige Blockierung des klassischen Komplementaktivierungswegs ausreicht, die UVA-induzierte C3-Spaltung in uroporphyrinhaltigem Serum nicht hemmt.

Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß auch nach Zugabe von 30 mmol EDTA zu diesem Serum noch eine etwa 30%ige C3-Spaltung nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA ausgelöst werden konnte, obwohl EDTA in dieser Konzentration zu einer vollständigen Blockierung der Komplementaktivierung sowohl des klassischen als auch des alternativen Wegs führt. Auch von Gigli et al wurde beobachtet, daß eine UVA-induzierte Komplementaktivierung durch Uroporphyrin noch in Gegenwart von EGTA/ Mg^{2+} und EDTA stattfindet. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit lassen daher vermuten, daß die phototoxische Komplementaktivierung durch Uroporphyrin zum Teil über den alternativen Weg erfolgen könnte. Während in früheren Publikationen von Lim und Gigli eine Komplementaktivierung über den klassischen Weg angenommen wurde, kann heute nicht ausgeschlossen werden, daß die phototoxische Komplementaktivierung durch Uroporphyrin auch noch über einen bisher unbekannten Mechanismus abläuft, der weder mit dem klassischen noch mit dem alternativen Weg identisch ist.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob die bei der PCT therapeutisch eingesetzten Substanzen-Chloroquin und beta-Carotin- einen hemmenden Einfluß auf die phototoxische Komplementaktivierung durch Uroporphyrin entfalten können.

Carotinoide sind Provitamine, die im Organismus in Vitamin A übergehen können. Sie sind chemisch gesehen Kohlenwasserstoffe der Formel $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ und besitzen zahlreiche Doppelbindungen (4). In Pflanzen, Algen, Bakterien und Tieren finden sie sich als protektive Substanzen (53, 73). Beim Menschen werden sie in der Haut abgelagert (41, 59), die dadurch eine gelb-bräunliche Farbe annimmt. Als Therapeutika wurden beta-Carotin und sein Derivat Canthaxanthin erstmals bei Patienten mit erythropoetischer Protoporphyrrie verwendet und sind inzwischen in vielen Testreihen weltweit erfolgreich erprobt (5, 7, 39, 46, 54, 71).

Die klinischen Erfahrungen über die therapeutische Wirksamkeit von diesen Carotinoiden bei PCT-Patienten sind unterschiedlich. Mathews-Roth (74) berichtet über einen erfolgreichen Therapieversuch bei einem Patienten, der über einen

Zeitraum von 2 Monaten mit beta-Carotin behandelt wurde. In anderen Studien bewährten sich Gaben von beta-Carotin und Canthaxanthin zur Prophylaxe der strahleninduzierten Hautveränderungen bei der PCT (25, 34, 92).

Ihr Wirkungsmechanismus ist noch nicht völlig geklärt. Eine therapeutische Wirkung der Carotinoide wäre als Lichtfilter denkbar, da sich die Absorptionsmaxima von Porphyrinen und Carotinen sehr ähnlich sind (40). Daher können die in der Hornschicht abgelagerten Carotinoide das für die Aktivierung der Porphyrine wichtige langwellige UV-Licht zum Teil absorbieren. Wie Versuche von Swanbeck und Wannersten (104) zeigten, liefert die Theorie des Lichtschutzes jedoch keine ausreichende Erklärung für die Wirkungsweise der Carotinoide. Schon seit längerem ist bekannt, daß beta-Carotin ein Fänger von freien Radikalen (36, 75) und Singulett-Sauerstoff (33, 72, 79) ist. Bei diesem Vorgang, dem sogenannten "Quenching", wird die Energie der aktivierten Porphyrine auf das Carotinmolekül abgeleitet und ausgelöscht. Durch diesen "Quench-Effekt" wäre auch eine hemmende Wirkung auf die phototoxische Komplementaktivierung durch Uroporphyrin nicht ausgeschlossen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher beta-Carotin in Konzentration bis zum 4-fachen des therapeutisch wirksamen Plasmaspiegel zu uroporphyrinhaltigen Normalserum (1,2 ug/ml) gegeben. Nach Bestrahlung mit 50 J/cm² UVA und Messung der C3-Spaltung mittels CIEP konnte keine hemmende Wirkung von beta-Carotin auf die phototoxisch-induzierte Komplementaktivierung festgestellt werden. Schon Gigli et al konnten zeigen, daß sich die phototoxische Komplementaktivierung durch Porphyrine auch nicht durch andere Radikalfänger bzw. "Quencher", wie Superoxiddismutase oder Katalase, hemmen ließ.

Das zur Therapie der PCT am meisten eingesetzte Medikament ist zur Zeit Chloroquin (50, 68, 97, 106), dessen Wirkungsmechanismus auch noch nicht vollständig geklärt ist. Gesichert ist, daß Chloroquin zu einer dramatischen Mobilisierung der Porphyrine im Gewebe und damit zu einem extremen passageren Anstieg der Porphyrinausscheidung im Urin führt, der nach einigen Wochen erheblich bis weit unter die Ausgangswerte abfällt (52). Es konnte gezeigt werden, daß dieser Effekt auf der Bildung eines äußerst wasserlöslichen

Chloroquin-Porphyrin-Komplexes in den Hepatozyten beruht, der aus der Leber freigesetzt und über den Urin ausgeschieden wird (102). Eine ganze Reihe anderer Arbeiten konnten nachweisen, daß die Porphyrine bei der PCT zu einem großen Teil an Plasmaproteine - vornehmlich an Hemopexin, aber auch an Albumin - gebunden sind (51, 78) und deshalb bei unbehandelten Patienten nur zu einem kleinen Teil über die Niere eliminiert werden (108).

Einige Autoren nehmen auch an, daß der Effekt von Chloroquin bei der PCT in der Beseitigung von Eisen aus der Leber beruht (106). Das Wirkungsspektrum von Chloroquin ist nicht auf die Eliminierung von Uroporphyrin und Eisen beschränkt. Verschiedene Studien zeigten, daß Chloroquin Lysosomenmembranen stabilisieren (44, 62, 112) und die Freisetzung von hydrolytischen Enzymen verzögern kann. Es ist ein potentieller Histamininhibitor, hat einen entzündungshemmenden Effekt und blockiert Antigen-Antikörperreaktionen (105). Ein Einfluß von Chloroquin auf die in dieser Arbeit nachgewiesene phototoxische Komplementaktivierung wäre durch zwei weitere in der Literatur beschriebene Wirkungsweisen denkbar. Seit längerer Zeit wird ein Lichtschutzeffekt von Chloroquin beschrieben (57, 99), der sich auch im UVA-Bereich auswirkt. Es ist dennoch ziemlich unwahrscheinlich, daß dieser Filtereffekt für Patienten mit photosensitiven Erkrankungen ausreichend ist (98).

Neblett und seine Mitarbeiter (84) beschrieben einen hemmenden Einfluß von Chloroquin auf die Komplementaktivierung und glaubten damit die Wirkung von Chloroquin bei Bindegewbserkrankungen wie Lupus erythematosus erklären zu können. Dies wurde von anderen Autoren (98) bezweifelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Chloroquin als Reinsubstanz in einer Konzentration, die dem therapeutisch wirksamen Serumspiegel (250-500 $\mu\text{g/ml}$) bei PCT entsprach, zu Normalserum gegeben, das Uroporphyrinwerte von 0,6 und 2,5 $\mu\text{g/ml}$ enthielt. Nach Bestrahlung mit 50 J/cm^2 UVA und Messung der C3-Spaltung mittels CIEP konnte keine direkt hemmende Wirkung von Chloroquin auf die phototoxische Komplementaktivierung durch Uroporphyrin nachgewiesen werden.

Es stellt sich die Frage, inwieweit die in vitro beobachtete phototoxische Komplementaktivierung durch Uroporphyrin auch

als pathophysiologisches Modell für die Entwicklung der entzündlichen Hautveränderungen bei Patienten mit *Porphyria cutanea tarda* gelten kann.

Histologisch zeigt sich in sonnenexponierter Haut von PCT-Patienten eine subepidermale Blasenbildung und im oberen Corium erweiterte Kapillaren, die von einem mäßig entzündlichen Infiltrat umgeben sind. Die Basalmembran ist intakt und weist mehrere Duplikationen auf. Die Zahl der Kollagenfibrillen ist in diesem Bereich vermindert (48, 88). Auch senile Elastose oder Elasticaschwund werden beobachtet. In der direkten Immunfluoreszenz kann man Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement um die Blutgefäße des oberen Coriums und an dermoepidermalen Grenzlinien nachweisen (14, 27). Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang, daß in nicht-lichtexponierter Haut von PCT-Patienten kein Komplement nachgewiesen werden konnte. Cormane et al vermuteten daher in der Haut von PCT-Patienten das Vorkommen eines photo-dynamisch induzierten Mechanismus, der möglicherweise die Komplementkaskade unabhängig von immunologischen Vorgängen aktivieren kann (14). Epstein et al (27) konnten zeigen, daß die entzündlichen Veränderungen in lichtexponierter Haut bei in Remission befindlichen Patienten mit klinisch inaktiver PCT, aber auch in nicht-lichtexponierter Haut von Patienten mit hohen Plasmaporphyrinspiegeln wesentlich schwächer ausgeprägt waren. Dies weist darauf hin, daß sowohl Licht als auch die gleichzeitige Anwesenheit von Porphyrinen für die Hautveränderungen bei der PCT nötig sind.

Um den Pathomechanismus der entzündlichen Reaktionen bei PCT besser zu verstehen, waren weitere Informationen über die Lokalisation und Art der Porphyrine in der Haut notwendig. Dankemeyer (17) und Schmid (101) konnten zeigen, daß Uroporphyrin die größte photosensibilisierende Wirkung aller Porphyrinfraktionen besitzt. In der Arbeit von Pathak und Burnett (87) war von allen Porphyrinen nur Uroporphyrin in allen Hautproben von Ratten mit hexachlorbenzol-induzierter Porphyrie nachweisbar, die ein Tiermodell für die toxisch ausgelöste *Porphyria cutanea tarda* (*Porphyria turcica*) darstellt. Takashi Miura et al (77) kamen in ihren Studien zum Ergebnis, daß es in der Haut von Ratten mit hexachlorbenzol-induzierter Porphyrie und von Menschen mit *Porphyria cutanea tarda* zu signifikanten Erhöhungen der Uro- und Hexacarboxy-

porphyrinspiegel kommt, die eine wichtige Rolle in der Auslösung der Photosensibilisierung spielen. In Untersuchungen über die Lokalisation der Porphyrine in der Haut fanden Runge und Watson (96) subepitheliale Porphyrinfluoreszenz in den Hautproben verschiedener Porphyriepatienten. Jarrett et al (45) beobachteten Fluoreszenz im Stratum corneum von Tieren nach Injektion von Porphyrievorstufen und nachfolgender Lichtexposition. Pathak und Burnett (87) konnten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie Porphyrine im Stratum corneum, in den Malpighischen Zellen und in der Dermis von verschiedenen Porphyriepatienten und von Ratten mit hexachlorbenzol-induzierter Porphyrie nachweisen.

Magnus et al (69) und Rimington et al (94) konnten bei PCT-Patienten Erytheme und Ödeme durch Bestrahlung mit monochromatischem Licht auslösen, und ein Wirkungsspektrum für die Hautläsionen aufstellen, das sich genau mit dem Absorptionsspektrum der Porphyrinmoleküle bei einem Maximum von 400 nm deckte (Runge und Watson (96)) gelang es ebenfalls Ödeme und Erytheme bei PCT-Patienten zu erzeugen, die mit Infra-Rotlicht vorbestrahlt und dann einer Lichtquelle von 400 nm exponiert wurden. Allerdings konnten durch derartige Lichttestungen bisher nur selten Blasen induziert werden (114). Lim und Gigli konnten nach Bestrahlung von protoporphyrinä-mischen Meerschweinchen mit Licht einer Wellenlänge von 405 nm Erytheme auslösen, die zum Teil erodierten und sich mit Krusten bedeckten. Histologisch zeigten sich nach 3 Tagen epidermale Nekrosen, dermale Ödeme, erweiterte Blutgefäße, Erythrocytenextravasate und Infiltrationen von neutrophilen Granulozyten. Bisher liegt aber kein Tiermodell ähnlicher Art mit uroporphyrinä-mischen Meerschweinchen vor.

Es wäre denkbar, daß die in dieser Arbeit in vitro nachgewiesene phototoxische Komplementaktivierung auch in vivo ausgelöst wird, wenn langwelliges UV-Licht durch die Epidermis dringt (beim weißen Hauttyp 45 %; (28)) und mit Uroporphyrinmolekülen reagiert, die entweder im Blut zirkulieren oder in der Haut abgelagert sind. Die Aktivierung der Komplementkaskade führt, wie oben schon erwähnt, zum Freisetzen von chemotaktisch und anaphylaktisch wirksamen Komplementfragmenten, die als Entzündungsmediatoren aktiv werden. Der hier beschriebene Mechanismus stellt also ein in-vitro-

Modell dar, das zum Verständnis der Pathogenese der licht-induzierten Schäden bei Porphyria cutanea tarda beitragen könnte. Es ist durchaus möglich, daß dieser Komplement-vermittelte Entzündungsprozeß, neben den direkten Zellschädigungen durch lichtaktivierte Porphyrine und ihren Reaktionsprodukten, zumindest teilweise an der Entwicklung der entzündlichen Hautveränderungen beteiligt ist, zumal sich diese Veränderungen vornehmlich an den Stellen finden, an denen auch immunhistologisch Komplementablagerungen nachgewiesen werden konnten..

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die phototoxische Komplementaktivierung im Serum von Patienten mit Porphyria cutanea tarda und im Serum von Normalpersonen nach Zusatz von Uroporphyrin unter verschiedenen Versuchsbedingungen in vitro untersucht. Serumproben von 14 Patienten mit klinisch gesicherter PCT wurden unter standardisierten Bedingungen mit langwelligen UV-Licht ($1-50 \text{ J/cm}^2$ UVA) bestrahlt. Anschließend wurde in den bestrahlten Serumproben die Abnahme der hämolytischen Gesamtkomplementaktivität (CH50) bestimmt und die Freisetzung von C3c-Spaltprodukten immunchemisch nachgewiesen. Zwischen beiden Meßgrößen bestand eine hohe Korrelation.

In den bestrahlten Patientenseren kam es zu einer signifikanten Abnahme der hämolytischen Aktivität, die mit dem Auftreten von C3c-Spaltprodukten verbunden war. Der phototoxisch-induzierte Komplementverbrauch nahm mit der Höhe der Porphyrinkonzentration im Serum und der eingestrahlten UVA-Dosis zu.

Die phototoxische Aktivierung des Komplementsystems in den Patientenseren konnte durch Zugabe von Uroporphyrin zu Normalserum in vitro reproduziert werden. Auch hier war das Ausmaß des Komplementverbrauchs von der Uroporphyrinkonzentration und der eingestrahlten UVA-Dosis abhängig.

Uroporphyrin konnte durch Vorbestrahlung mit 100 J/cm^2 UVA deutlich inaktiviert werden. Dies spricht dafür, daß Uroporphyrin nur im kurzzeitigen durch UVA-Licht angeregten Zustand zu einer Komplementaktivierung fähig ist.

Chelatbildner beeinflussten die UVA-induzierte Komplementaktivierung durch Uroporphyrin unterschiedlich, wobei Zusatz von EGTA zu keiner und Zusatz von EDTA nur zu einer teilweisen Hemmung führte. Dies läßt vermuten, daß die phototoxische Komplementaktivierung zum Teil über den alternativen Weg abläuft, aber daß auch noch ein bisher unbekannter Mechanismus angenommen werden muß.

An Hand der Ergebnisse wurde diskutiert, inwieweit das Komplementsystem an den entzündlichen Hautveränderungen bei

PCT-Patienten beteiligt sein könnte. Es kann vermutet werden, daß die durch UVA-Licht angeregten Porphyrinmoleküle nicht nur zur Bildung von Peroxiden und freien Radikalen mit direkten membrantoxischen Wirkungen führen, sondern auch einen Effekt auf das Komplementsystem entfalten. Durch eine Aktivierung der Komplementkaskade würden Entzündungsmediatoren freigesetzt, die möglicherweise an der Entwicklung der entzündlichen Hautveränderungen bei Porphyria cutanea tarda beteiligt sein könnten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Allison, AC. et al (1966): Role of lysosomes and of cell membranes in photosensitization.
Nature 209:874-878.
- 2 Andy, JH.: Letter (1974): Pathogenesis and natural history of porphyria cutanea tarda.
Lancet 2, 213.
- 3 Augener, W.; Grey, HM.; Cooper, NR. and Müller-Eberhard, JH. (1971): The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with C1.
Immunochemistry 8:1011-1020.
- 4 Auterhoff, H.: Vitamine in: Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie 1980, S. 567.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- 5 Baart de la Faille, H.; Rottier, PB. Baart de la Faille-Kuyper (1972): beta-Caroten as a treatment for photohypersensitivity due to erythropoietic protoporphyria.
Dermatologica (Basel) 145:389-394.
- 6 Barth, J.; Dr. Kipoina D. (1971): Unter Hormontherapie aufgetretene Porphyria cutanea tarda mit anhaltender Porphyrinausscheidung.
Dermatol Monatsschr 157: 160-167.
- 7 Beckert, E.; Metz, G. (1974): Zur beta-Karotin-Behandlung der erythropoetischen Protoporphyrrie.
Hautarzt 25:195-196.
- 8 Behm, AR.; Unger, WD. (1974): Oral contraceptives and porphyria cutanea tarda.
Can Med Assoc J 110:1052-1054.
- 9 Bodaness, RS.; Chan, PC. (1977): Singlet oxygen as a mediator in the hematoporphyrin-catalyzed photooxidation of NADPH to NADP⁺ in deuterium oxide.
J Biol Chem 252:8554-8560.

- 10 Borlande, RP.; Wurz, L.; Ecker, EE. (1963): Photodynamic Action II. The Effects of Photodynamic Action on certain Properties of Human Serum.
Arch Pathol 75:123-126.
- 11 Borsos, T.; Rapp, JH. and Mayer, MM. (1961): Studies on the second component of complement.
J Immunol 87:310-321.
- 12 Chenoweth, DH.; Cooper, SW.; Hugli, TE. et al (1981): Complement activation during cardiopulmonary bypass.
N Engl J Med 304:497-503.
- 13 Cochrane, CG.; Müller-Eberhard, HJ.; Aikin, BS. (1968): The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components of human complement.
J Exp Med 127:371-386
- 14 Cormane, RH.; Szabo, E.; Tio Tiong, Hoo (1971): Histopathology of the Skin in Aquired and Hereditary Porphyria cutanea tarda.
Br J Derm 85:531-538.
- 15 Craddock, RP.; Fehr, J.; Dalmasso, AP. et al (1977): Pulmonary vaskular leukostasis resulting from complement activation by dialyses cellophane membranes.
J Clin Invest 59:879-888.
- 16 Creutzfeld, W.; Beck, K.; Clotten, R.; Bianchi, L.; Bianchi, L. (1966): Die Leber bei den hepatischen Porphyrien mit besonderer Berücksichtigung der Porphyria cutanea tarda.
Acta Hepatosleno 13:65-83.
- 17 Dankemeyer, W. (1970): Über die photosensibilisierende Wirkung von Porphyrinen.
Inaug. Diss., Hamburg. Riefing und Weingärtner.
- 18 Doss, M. (1977): Porphyriediagnostik.
Med Welt 28:507-508.
- 19 Doss, M. (1969): Zur Wirkung von Östradiol und Progesteron auf die Porphyrinsynthese in Leberzellkulturen.
Klin Wochenschr 47: 228-229.

- 20 Doss, M. (1977): Pathobiochemie der Porphyrien.
Med Klinik 72:1501-1518.
- 21 Doss, M. et al (1971): Conversion of porphyrin methyl esters to zinc and copper chelates of spectrophotometric analysis.
Anal Biochem 39:7-14.
- 22 Doss, M. et al: Principal Methods in Clinical Biochemistry Bd. 2 Curtius und Roth; Walter de Greuther Verlag 1973/74, S. 13-23 bis 13-71.
- 23 Doss, M.; Schermuly, E.; Look, D.; Henning, H.: Enzymatic defects in chronic hepatic porphyrias.
in: Porphyrins in human diseases. Proc. I.
Inte Porphyrin Meeting, Freiburg 1975.
Karger Basel (1976).
- 24 Doss, M.; von Tiepermann, R.; Look, D.; Henning, H.; Nikolowski, J.; Ryckmanns, F. und Braun-Falco, O. (1980): Hereditäre und nicht-hereditäre Form der chronischen hepatischen Prophyrie: Unterschiedliches Verhalten der Uroporphyrinogen-Decarboxylase in Leber und Erythrocyten.
Klin Wochenschrift 58:1347-1356.
- 25 Eales, L. (1978): The effects of canthaxanthin on the photocutaneous manifestations of porphyria.
Sth Afr Med J 54:1050-1052.
- 26 Elder, GH.; Lee, GB.; Tovey, JA. (1978): Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda.
N Engl J Med 299:274-278.
- 27 Epstein, JH.; Tuffanelli, DL.; Epstein, WL. (1973): Cutaneous Changes in the Porphyrrias.
Arch Dermatol 107:689-698.
- 28 Everett, MA.; Yeagers, E.; Sayre, RM.; Olson, RL. (1966): Penetration of epidermis by ultraviolet rays.
Photochem Photobiol 5:533-542.

- 29 Fearon, DT.; Austen, KF. (1977): Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan bound amplification convertase to endogeneous regulatory mechanisms.
Proc Natl Acad Sci 74:1683-1687.
- 30 Fearon, DT.; Ruddy, S.; Schur, H.; McCabe, WR. (1975): Activation of the properdin pathway of complement in patients with gram-negative bacteremia.
N Engl J Med 292:937-940.
- 31 Felsher, RF.; Norris, ME.; Shih, JC. (1978): Red-cell uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda and in other forms of porphyria.
N Engl J Med 299:1095-1098.
- 32 Fine, DP.; Marney, SR.; Colley, DG.; Sergeant, JS.; Des Prez, RM. (1972): C3 Shunt activation in human serum chelated with EGTA.
J Immunol 109:807-809.
- 33 Foote, CS.; Denny, RW. (1973): Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by beta-carotene.
J Am Chem Soc 90:6233-6235.
- 34 Franceschini, P.; Godeau, P.; Wechsler, B.; Giral, P.; Wechsler, J. (1981): Traitement du lupus erythemateux et des dermatoses photosensibles par les carotenoides.
Nouv Presse med 10:1938-1942.
- 35 Frank, MM.; Rupp, HJ.; Borsos, T. (1964): Studies on the terminal steps of immune hemolysis. I. Inhibition by trisodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA).
J Immunology 93:409-418.
- 36 Fujimori, E.; Tavla, M. (1966): Light induced electron transfer between chlorophyllin and hydroxyquinone and the effect of oxygen and beta-carotene.
Photochem Photobiol 5:877-887.
- 37 Gigli, I.; Austen, KF. (1969): Fluid phase destruction of C4 by C1: Its enhancement and inhibition by homologous and heterologous C4.
J Exp Med 129:679-680.

- 38 Gigli, I. and Nelson, RA. (1968): Complement dependent immune phagocytosis.
Exp Cell Res 51:45-67.
- 39 Goerz, G.; Ippen, H. (1977): Carotenoid-Behandlung von Lichtdermatosen.
Dt med Wschr 102:1051-1055.
- 40 Goldstein, BD.; Harber, LC. (1972): Erythropoietic protoporphyria: Lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis.
J Clin Invest 51:892-902.
- 41 Grof, P.; Bodzay, J.; Kovacs (1967): Carotenodermia.
Acta Med Sci Hungar 24:129-139.
- 42 Gutzwiller, P. (1973): Porphyrrie und Ovulationshemmer.
Dermatologica 146:342-345.
- 43 Hochstein, P.; Ernstner, L. (1964): Microsomal peroxidation of lipids and its possible role in cellular injury, In: CIBA Foundation Symposium on cellular Injury. Edited by AVS De Reuck, J. Snight.
Boston, Little, Brown S. 123-146.
- 44 Ignarro, LJ. (1971): Effects of anti-inflammatory drugs on the stability of rat liver lysosomes in vitro.
Biochem Pharmacol 20:2847-2860.
- 45 Jarrett, A.; Rimington, C.; Willoughby, DA. (1956): Delta-aminolevulinic acid and porphyria.
Lancet 1:125-129.
- 46 Karpati, S.; Török, E.; Kramer, M. (1977): Behandlung der Protoporphyrria erythropectica und der Hydroa vaccini-formis mit beta-Carotin.
Börgeygy, Vener Szle 53:227-235.
- 47 Keining, E.; Braun-Falco, O.: Porphyrrien in: Dermatologie und Venerologie.
J. Lehmanns Verlag München 1969, S. 705-706.

- 48 Klostermann, GF.; Ritzenfeld, P. (1963): Über Porphyrria cutanea tarda.
Arch klin exp Derm 216:373-390.
- 49 Kolb, WP.; Haxby, JA.; Arroyave, CM. and Müller-Eberhard, HJ. (1972): Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement.
J Exp Med 135:549-566.
- 50 Kordac, V. et al (1974): Treatment of porphyria cutanea tarda with Chloroquine.
Br J Derma 90:95-100.
- 51 Koskelo, P.; Toivonen, J.; Rintola, P. (1970): The binding of ^{14}C -labelles porphyrins by plasma proteins.
Clin Chim Acta 29: 559-565.
- 52 Kowertz, MJ.: Hepatocutaneous recovery in Porphyrria cutanea tarda. In: Doss (ed): Porphyrins in Human Diseases, S. 356-360.
Basel: Karger-Verlag 1976.
- 53 Krinsky, NI.: The protective functions of carotenoid pigments. In: Photophysiology. Vol. 3. Edited by Giese AC.
Academic Press, New York. S. 123-195.
- 54 Krook, G.; Haeger-Aronson, B. (1974): Erythropoetic protoporphyria and its treatment with beta-carotene.
Acta dermatavenereol (Stockholm) 54:39-44.
- 55 Kushner, JP.; Barbuto, A.; Lee, GR. (1976): An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda: Decreased Uroporphyrinogen decarboxylase activity.
J Clin Invest 58:1089-1098.
- 56 Lachmann, PJ. and Müller-Eberhard, HJ. (1968): The demonstration in human serum of conglutinin-activity factor and its effect on the third component of complement.
J Immunol 100:691-698.

- 57 Langlo, L. (1957): The efficiency of local application of chloroquine and mepacrine in preventing the effects of ultraviolet rays on human skin.
Acta Derm Venereol 37:85-91.
- 58 Laurell, CB. (1965): Antigen-antibody crossed elektro-phoresis.
Anal Biochem 10:358-361.
- 59 Lee, R.; Mathews-Roth, MM.; Pathak, MA.; Parrish, JA. (1975): The detection of carotenoid pigments in human skin.
J Invest Derm 64:175-177.
- 60 Leon, MA. (1958): Quantitative studies on the properdin-complement system. III. Kinetics of the reaction between C3 and the properdin zymosan complex.
J Immunol 81:23-28.
- 61 Lepow, IH.; Da Silva, W.; Eisele, JW.: Nature and biological properties of human anaphylatoxin, in: K.F. Austen, EL Becker Biochemistry of the acute allergic reaction. Blackwell, Oxford S. 265.
- 62 Lie, SO.; Schofield, B. (1973): Inactivation of lysosomal function in normal cultured human fibroblasts by chloroquine.
Biochem Pharmacol 22:3109-3114.
- 63 Lim, HW.; Gigli, I. (1981): Role of Complement in Porphyrin-induced Photosensitivity.
J Invest Derm 76:4-9.
- 64 Lim, H.; Gigli, I (1981): The Role of Complement in Phototoxic Reactions.
Springer Semin Immunopathol 4:209-219.
- 65 Lim, HW.; Perez, HD.; Goldstein, IM.; Gigli, I. (1981): Complement-derived chemotactic Activity is Generated in Human Serum Containing Uroporphyrin after Irradiation with 405 nm Light.
J Clin Invest 67:1072-1077.

- 66 Lim, HW.; Perez, HD.; Goldstein, IM.; Gigli, I. (1980): Ultraviolet-A irradiation provokes generation of complement-derived proinflammatory peptides in human serum containing uroporphyrins.
Clin Res 28: 476A.
- 67 Lim, HW.; Perez, HD.; Poh-Fitzpatrick, M.; Goldstein, IM.; Gigli, I. (1981): Generation of chemotactic activity in serum from patients with erythropoietic protoporphyria and porphyria cutanea tarda.
N Engl J Med 304:212-215.
- 68 London, ID. (1957): Porphyria cutanea tarda: report of a case successfully treated with chloroquine.
Arch Dermatol 75:801-803.
- 69 Magnus, IA: Biologic action spectra. In: Biologic effects of Irradiation.
Urbach Editor, Pergamon Press 1969, S. 178.
- 70 Mancini, G.; Carbonara, AO. and Heremans, JF. (1965): Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2:235-254.
- 71 Mathews-Roth, MM. (1979): Carotenoid therapy of photosensitivity.
Int J Derm 18:835-836.
- 72 Mathews-Roth, MM. (1982): Photosensitization by porphyrins and prevention of photosensitization by carotenoids.
J Nat Cancer Inst 69:279-285.
- 73 Mathews-Roth, MM.; Krinsky, NI. (1970): Studies on the protective function of the carotenoid pigments of *Sarcina lutea*.
Photochem Photobiol 11:419-428.
- 74 Mathews-Roth, MM.; Pathak, MA.; Fitzpatrick, TB.; Harber, LC.; Kass, Eh. (1977): Beta-carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitive diseases.
Arch Derm (Chicago) 113:1229-1232.

- 75 Mathews-Roth, MM.; Wilson, T.; Fujimori, E. (1974): Carotenoid chromophore length and protection against photosensitization.
Photochem Photobiol 19:217-222.
- 76 Mauzerall, D.; Feher, G. (1964): A study of the photo-induced porphyrin free radical by electron spin resonance.
Biochem Biophys Acta 79:430-432.
- 77 Miura, T.; Torinuki, W.; Kumai, N.: Skin porphyrin levels in Porphyrria. In: Symposium of Porphyrrias. XVI Congressus Internationalis Dermatologiae 1982, S. 73-80.
- 78 Morgan, WT.; Sutor, RP.; Müller-Eberhard, U.; Koskelo, P. (1975): Interaction of rabbit hemopexin with copro and uroporphyrin.
Biochem Biophys Acta 400:415-422.
- 79 Moshell, AN.; Bjornson, L. (1975): Photoprotection in erythropoetic protoporphyria. Mechanism of photoprotection by beta-carotene.
J Invest Derm 68:157-160.
- 80 Müller-Eberhard, HJ.: The Molecular Basis of the biological activities of complement. In: The Harvey lectures, Series 66.
Academic Press, New York, S. 75.
- 81 Müller-Eberhard, HJ.; Goetze, O. (1972): C3 proactivator convertase and its mode of action.
J Exp Med 135:1003-1008.
- 82 Müller-Eberhard, HJ.; Polley, MH. and Calcott, MA. (1967): Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and fourth components of human complement.
J Exp Med 125:359-380.
- 83 Mutzhas, MF.; Hölzle, E.; Hofmann, C.; Plewig, G. (1981): A new apparatus with High Radiation Energy between 320-460 nm physical Description and Dermatological Applications.
J Invest Derma 76:42-47.

- 84 Neblett, TR.; Burnham, TK.; Kay, N. (1965): Chloroquine: Its mechanism of action upon immune phenomena. Arch Derma 92:720-725.
- 85 Nelson, RA.; Jensen, J.; Gigli, I. et al (1966): In: Methods for the separation, purification and measurement of nine components of hemolytic complement in guinea serum. Immunochemistry 3:111-135.
- 86 Osler, AG.; Mayer, MM. (1953): Studies of the role of Ca^{2+} and Mg^{2+} in complement fixation and immune hemolysis. III. The respective roles of Ca^{2+} and Mg^{2+} in immune hemolysis. J Immunology 71:374-381.
- 87 Pathak, MA.; Burnett, JW. (1964): The intracellular localization of porphyrins. J Invest derm 43:421-427.
- 88 Pearson, RW.: Epidermolysis bullosa, porphyria cutanea tarda and erythema multiforme. In: Ultrastructure of normal and abnormal skin; von A.S. Zelickson. Kimpton, London 1967, S. 320-334.
- 89 Pfaffenbach, G.; Lamm, M. and Gigli, I. (1978): Activation of complement by mouse IgA immune-complexes. Fed Proc 37:1377.
- 90 Pillemer, L.; Blum, L.; Pensky, J.; Lepow, IH. (1953): The requirement for magnesium ions in the inactivation of the third component of human complement (C'_3) by insoluble residues of yeast cells (zymosan). J Immunol 71:331-338.
- 91 Polley, MJ.; Müller-Eberhard, HJ. (1978): The second component of human complement: Its isolation, fragmentation by C1 -Esterase and incorporation into C3 convertase. J Exp Med 128:533-551.

- 92 Raab, W.: Klinische Prüfung von Varocaps, einem hochdosierten Carotinoid-Präparat mit 25 mg beta-Karotin und 35 mg Canthaxanthin pro Dragee.
Prüfbericht 1982.
- 93 Rapp, HJ. and Borsos, T.: "Molecular Basis of Complement action".
Appleton-Century-Crofts, New York, 1970.
- 94 Rimington, C. et al (1967): Porphyria and photosensitivity.
Q J Med 36:29-57.
- 95 Ruddy, S.; Austen, KF. (1971): C3b-inactivator in man. II. Fragments produced by C3b inactivator cleavage of cell-bound or fluid phase C3b.
J Immunol 107:742-750.
- 96 Runge, W.; Watson, CJ. (1962): Experimental production of skin lesions in human cutaneous porphyria.
Proc Soc Exp Biol Med 109:809-811.
- 97 Saltzer, EI. et al (1968): Porphyria cutanea tarda: remission following chloroquine administration without adverse effects.
Arch Dermatol 98:496-498..
- 98 Sams, WM. Jr.: Chloroquine (1976): Its use in photosensitive eruptions.
Int J Derm 15:99-111.
- 99 Sams, WM Jr.; Carroll, NV. (1966): The "spectral shift" phenomenon of chloroquine.
Arch Derm 93:123-128.
- 100 Scharfstein, J.; Ferreira, A.; Gigli, I. and Nussen-zweig, V. (1978): Human C4-binding protein.
J Exp Med 148:207-222.
- 101 Schmid, R.: The porphyrias. Chapter 30 in: The Metabolic Basis of Inherited Disease. Edited by J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden and D.S. Fredrickson.
New York, Mc Graw-Hill Book Company, Inc., 1960, S. 939-1012.

- 102 Schonick, PL.; Epstein, J.; Marver, HS. (1973): The molecular basis of the action of chloroquine in porphyria cutanea tarda.
J Invest Derm 61:226-232.
- 103 Slater, TA.; Riley, PA. (1966): Photosensitization and lysosomal damage.
Nature 209:151-154.
- 104 Swanbeck, G.; Wannersten, G. (1973): Effect of beta-carotene on photohemolysis.
Acta Dermatovener (Stockholm) 53:283-289.
- 105 Szilagi, T.; Kawai, M. (1970): The effect of chloroquine on the antigen-antibody reaction.
Acta Physiol Acad Sci Hung 38:411-419.
- 106 Taljaard, JJF.; Shanley, BC., Stewart-Wynne, EG.; Deppe, WM.; Joubert, SM. (1972): Studies on low dose chloroquine therapy and the action of chloroquine in symptomatic porphyria.
Br J Derm 87:261-269.
- 107 Till, G.; Papke-Hess, C.; Rother, U. et al: In (1978): Clin. Aspects of the Complement System, Ed. Opferkuch, W. Rother, K. and Schultz Dr., S. 162.
- 108 Topi, GC.; D'Alessandro Gandolfo L.; Griso, D.; Aman-tea, A.: Clearance of Porphyrins in Porphyria Cutanea Tarda. In: Symposium of Porphyrias, XVI Congressus Internationalis. Dermatologiae in Tokio 1982, S. 67-72.
- 109 Torinuki, W.; Miura, T.; Seiji, M. (1980): Lysosome destruction and lipoperoxidase formation due to active oxygen generated from haematoporphyrin and UV irradiation.
Br J Dermatol 102:17-27.
- 110 Van de Velde, R. (1973): Störungen des Porphyrin-Stoffwechsel.
Fortschr Med 91:1025-1027.

- 111 Vogt, W.; Schmidt, G.; von Buttlar, B.; Dieminger, L. (1978): A new function of the activated third component of complement: Binding to C5, an essential step for C5 activation.
Immunology 34:29-40.
- 112 Weissmann, G. (1964): Labilization and stabilization of lysosomes.
Fed Proc 23:1038-1044.
- 113 Whaley, K.; Ruddy, S. (1976): Modulation of the alternative complement pathway by beta-1-H globulin.
J Exp Med 144:1147-1163.
- 114 Wiskemann, A.; Wulf, K. (1959): Zur Lichtprovokation der Porphyrin-Dermatosen.
Arch Klin Exp Dermatol 209:454-465.
- 115 Wuepper, KD.; Bokisch, VA.; Müller-Eberhard, HJ.; Stoughton, RB. (1972): Cutaneous responses to human C3 anaphylatoxin in man.
Clin Exp Immunol 11:13-20.
- 116 Wurz, L.; Ratuoff, DD.; Pillemer, L. (1954): Studies on the mechanism of inactivation of human complement by plasmin and by antigen-antibody aggregates.
I. The requirement for a factor resembling C'1 and the role of Ca^{2+} .
J Immunology 73:146-155.

Danksagung

Herrn Prof. Dr.med. Dr.h.c. O. Braun-Falco danke ich für die Überlassung des Themas und für die Arbeitsmöglichkeit an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

Herrn OA Dr.med. Meurer möchte ich für die Vorbereitung und Förderung der Arbeit sowie für die freundliche Beratung herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr.med. Goerz und Herrn Bolsen bedanke ich mich für die Zusendung des größten Teils der Patientenseren und für eine Reihe wertvoller Auskünfte.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Frau Nau und Frau Heilmann für die labortechnische Beratung.

Lebenslauf

Am 21.1.1959 wurde ich, Christof Manfred Schulte, als drittes Kind des Kinderarztes Dr.med. Hubert Schulte und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Sasse, in Mannheim geboren.

Von 1964-1968 besuchte ich die Volksschule in Lampertheim und anschließend das Gauß-Gymnasium in Worms. 1975 wechselte ich auf die gymnasiale Oberstufenschule in Lampertheim über, wo ich 1977 das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1977/78 begann ich mit meinem Medizinstudium an der Universität Saarbrücken. Im Sommersemester 1981 setzte ich mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München fort, wo ich im März 1983 den 2. Abschnitt des ärztlichen Staatsexamen ablegte. Mein praktisches Jahr mit dem Wahlfach Dermatologie begann ich im April 1983. Die Approbation werde ich voraussichtlich im Frühjahr 1984 erhalten.

